

BC-C/283

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

Departamento de Biología Molecular

Síntesis y regulación de la expresión del antibiótico poliquétido
Actinorhodina en *Streptomyces coelicolor* A3(2)

Miguel Angel Fernández Moreno



Reg. BC: 46087

Mayo, 1990

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

Departamento de Biología Molecular

**Síntesis y regulación de la expresión del antibiótico poliquétido
Actinorhodina en *Streptomyces coelicolor* A3(2)**

Memoria presentada para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas
por el licenciado

Miguel Angel Fernández Moreno

Director : Dr.D.Francisco Malpartida Romero
Investigador científico del CSIC (CNB)

Agradecimientos :

Al doctor Francisco Malpartida Romero, director de este trabajo, por su capacidad de trabajo, entrega, y disponibilidad extraordinarias.

Al profesor D.A.Hopwood, del John Innes Institute de Norwich, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio como un miembro más de su equipo.

Al doctor Rafael Pérez Mellado, por aceptar la ponencia de esta tesis.

Tengo la gran suerte de que resulte materialmente imposible mencionar a todos aquellos que de una manera u otra, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en el John Innes Institute o en el departamento de Biología Molecular de la UAM, me han hecho más agradable las cosas durante estos años. Personas que, ofreciendo desde una sonrisa en un pasillo hasta horas de trabajo en un despacho, me han animado y enseñado.

Querría hacer llegar desde aquí mi especial gratitud a mis compañeros de laboratorio y a Elena por sus ánimos, tolerancia y paciencia.

A Aline

A mis padres

A mi hermano

INDICE

ABREVIATURAS

I.- INTRODUCCION

I.1.- Características generales del género <u>Streptomyces</u>	1
I.1.1.- Ciclo biológico de los <u>Streptomyces</u>	
I.1.2.- Metabolismo en <u>Streptomyces</u>	2
I.2.- Organización génica en <u>Streptomyces</u>	3
I.3.- Control de la expresión génica en <u>Streptomyces</u>	5
I.3.1.- A nivel de transcripción	
I.3.2.- A nivel de traducción.....	7
I.4.- <u>S.coelicolor</u> como modelo de estudio.....	8
I.5.- Actinorhodina como modelo de estudio.....	12
I.6.- <u>Streptomyces</u> : presente y perspectivas.....	15
I.7.- Biotecnología de antibióticos y futuro.....	16

II.- OBJETIVOS.....	18
---------------------	----

III.- MATERIALES Y METODOS

III.1.- Productos químicos.....	19
III.2.- Productos radiactivos	
III.3.- Enzimas	
III.4.- Cepas bacterianas utilizadas	
III.4.1.- <u>Streptomyces</u>	
III.4.2.- <u>E.coli</u>	20
III.5.- Lista de plásmidos y fagos utilizados	
III.5.1.- <u>Streptomyces</u>	
III.5.2.- <u>E.coli</u>	21
III.6.- Medios de cultivo	
III.6.1.- <u>E.coli</u>	
III.6.2.- <u>Streptomyces</u>	

III.7.- Soluciones y tampones	22
III.8.- Conservación y selección de cepas.....	23
III.9.- Preparación de organismos y fagos	
III.9.1.- <u>Streptomyces</u>	
III.9.1.1.- Suspensión de esporas	
III.9.1.2.- Preparación de micelio	
III.9.1.3.- Pregeminación de esporas	
III.9.1.4.- Preparación de protoplastos.....	24
III.9.1.5.- Preparación de fagos : aislamiento y conservación	
III.9.1.6.- Obtención de lisógenos	
III.9.2.- <u>E.coli</u>	
III.9.2.1.- Preparación de células competentes	
III.9.2.2.- Preparación de fagos : conservación	
III.9.3.- Otros	
III.10.- Preparación de DNA.....	25
III.10.1.- Minipreparaciones de plásmidos	
III.10.2.- Preparación de DNA en gradientes de densidad de ClCs	
III.10.3.- Preparación de DNA cromosómico de <u>Streptomyces</u>	
III.10.4.- Preparación de DNA de fagos de <u>Streptomyces</u>	
III.10.5.- Preparación de DNA de colifagos. Cadena doble y cadena sencilla.....	26
III.11.- Preparación de RNA de <u>Streptomyces</u>	
III.12.- Transformación génica	
III.12.1.- <u>Streptomyces</u>	
III.12.2.- <u>E.coli.</u>	
III.13.- Transfección génica	
III.13.1.- <u>Streptomyces</u>	
III.13.2.- <u>E.coli</u>	27
III.14.- Ensayos de actividad biológica	
III.15.- Manipulación de ácidos nucleicos	
III.15.1.- Digestión enzimática del DNA	

III.15.2.- Defosforilación de extremos 5' de DNA	
III.15.3.- Relleno de extremos cohesivos de DNA.....	28
III.15.4.- Ligación de fragmentos de DNA	
III.15.5.- Digestión de DNA con Exonucleasa III	
III.15.6.- Digestión de DNA con Bal31	
III.15.7.- Electroforesis en geles de agarosa	
III.15.8.- Electroforesis en geles de acrilamida	
III.15.9.- Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa.....	29
III.15.10.- Preparación de sondas radiactivas de DNA	
III.15.11.- Obtención de extremos 5' y 3' de DNA marcados radiactivamente	
III.15.12.- Transferencia de DNA a filtros de nitrocelulosa e hibridación de Acidos nucleicos.	
III.15.13.- Mapeo de S1 de alta resolución	
III.15.14.- Secuenciación del DNA.....	30
III.15.15.- Mutagénesis dirigida de DNA	
III.16.- Soporte informático	

IV.- RESULTADOS

IV.1.- Tabla de clones realizados en este trabajo	
IV.1.1.- <u>Streptomyces</u>	
IV.1.2.- <u>E.coli</u>	
IV.1.- Secuenciación de la región implicada en las primeras etapas de biosíntesis de actinorhodina.....	32
IV.1.1.- Función deducida para las presuntas ORF's de expresión temprana y media del cluster <u>act</u>	46
IV.1.1.1.- ActIORF1 y actIORF2	
IV.1.1.2.- ActIORF3	48
IV.1.1.3.- ActIORF4	49
IV.1.1.4.- Probable papel del resto de las ORF's de expresión temprana y media	
IV.1.1.5.- Posible función de las secuencias especiales no codificantes situadas al final de la actORF9.....	51

IV.2.- Región central del cluster <u>act.</u>	53
IV.2.1.- Secuenciación y análisis de la región central del cluster.....	55
IV.2.1.1.- Región dispensable definida por las actIIORF2 y 3.....	63
IV.2.1.2.- Región codificante del regulador positivo del cluster <u>act.</u>	65
IV.2.2.- Caracterización del gen regulador del cluster <u>act.</u>	69
IV.2.2.1.- A nivel de transcripción	
IV.2.2.2.- A nivel de promotor	71
IV.2.2.3.- A nivel de traducción	73
IV.2.2.4.- A nivel de producto génico actIIORF4	
IV.3.- Caracterización de secuencias de activación pleiotrópicas.....	77
IV.3.1.- Funcionalidad de las secuencias <u>smas.</u>	82
IV.3.2.- Caracterización de la región <u>smas.</u>	83
IV.3.2.1.- A nivel de transcripción	
IV.3.2.2.- A nivel funcional.....	84
 V.- DISCUSION	
V.1.- Región de expresión temprana y media	89
V.2.- Región reguladora interna al cluster.....	94
V.3.- Región reguladora de acción pleiotrópica	101
V.4.- Visión general.....	102
 VI.- CONCLUSIONES.....	103
 VII.- BIBLIOGRAFIA.....	104

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
acp	acyl carrier protein (proteína transportadora de acilos).
<u>afsB</u>	gen regulador de la biosíntesis del factorA y otros metabolitos secundarios en <u>S.coelicolor</u> .
<u>afsC</u>	gen implicado en el control de la biosíntesis de metabolitos secundarios en <u>S.coelicolor</u> .
Ap	ampicilina
amp ^r	resistencia a ampicilina
act	actinorhodina
<u>bld</u>	bald (calvo). Mutación en <u>S.coelicolor</u> que impide la diferenciación de micelio sustrato a micelio aéreo dando lugar a un fenotipo característico.
BrEt	bromuro de etidio
CDA	antibiótico dependiente de calcio
Cm ^r	resistencia a cloramfenicol
col.	colaboradores
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreititol
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
Fig.	figura
grms.	gramos
gyl	referencia a glicerol
Hyg	higromicina
hyg ^r	resistencia a higromicina. Proporcionada por el gen <u>hyg^r</u> de <u>S.hygroscopicus</u>
IPTG	isopropil β-D tiogalagalactopiranosido
Kan	kanamicina
Kan ^r	resistencia a kanamicina
kb	kilobases
IA1	tampón de lisis alcalina nº 1
IA2	tampón de lisis alcalina nº 2
<u>mmv</u>	grupo de genes estructurales y, al menos, un regulador negativo de metilenomicina en <u>S.coelicolor</u> .
mRNA	RNA mensajero
MM	medio mínimo
neo ^r	resistencia a neomicina determinada por el gen <u>aphII</u> del transposón Tn5.
μCi	microcurios
ORF	open reading frame, fase de lectura abierta
pb	pares de bases
PEG	polietilen glicol
RBS	ribosoma binding site, sitio de unión del ribosoma
<u>redD</u>	gen regulador de la expresión de prodigiosina interno al cluster en <u>S.coelicolor</u>
Ref.	referencia
RNA	ácido ribonucleico
<u>smas</u>	secondary metabolism activator sequences
Str	estreptomicina
Str ^r	resistencia a estreptomicina
TCA	ácido tricloroacético
TSB	transformation and storage buffer, tampón de almacenaje y transformación
tRNA	RNA de transferencia
ts	thioestrepton
ts ^r	resistencia a thioestrepton determinada por el gen <u>ts^r</u> de <u>S.azureus</u> .
ufp	unidades formadoras de placas de lisis
<u>vph</u>	gen que determina resistencia a viomicina en <u>S.vinaceus</u> .
<u>whiG</u>	gen cuya mutación impide el plegamiento de las hifas aéreas en <u>S.coelicolor</u> . Fenotípicamente la colonia es blanca.
<u>whiE</u>	gen cuya mutación bloquea la maduración de las esporas en <u>S.coelicolor</u> , generando un fenotipo similar a otros mutantes Whi.
wt	wild type, tipo salvaje
Xgal	5-bromo, 4-cloro, 3-indolil, β-galactopiranosido
<u>Xyle</u>	gen de catecol dioxigenasa de <u>Pseudomonas putida</u>

I.- INTRODUCCION

Si consideramos la biotecnología como una rama de la ciencia tendiente al aprovechamiento de los recursos disponibles en los seres vivos, no podríamos considerarla una actividad nueva, pues ya los sumerios, hace más de 7000 años, aprovechaban distintos procesos biológicos para la obtención de alcohol y vinagre. Sin embargo, ha sido en este siglo cuando se ha ido más allá del simple aprovechamiento de un sistema y hemos comenzado a comprender los mecanismos y las posibilidades que encierran multitud de procesos biológicos, en ocasiones utilizados de modo rutinario.

Desde mediados de la década de los 50, los datos sobre la estructura y función de los ácidos nucleicos se suceden, hasta que en los años 70, con el descubrimiento de los enzimas de restricción y la posibilidad de formar DNA's híbridos, se abren las puertas de la manipulación genética (Watson y Crick, 1953; Smith y Wilcox, 1970; Singer y Soll, 1973).

Entre las inmensas posibilidades generadas por los avances de la biología molecular, se encontraba la manipulación directa de algunos genes y microorganismos implicados en procesos de interés industrial. Un grupo de esos microorganismos fue el constituido por las bacterias del género Streptomyces.

I.1.- Características generales del género Streptomyces.

Los Streptomyces, aunque fueron confundidos con hongos hasta mediados de los 50 (Cohn, 1875; Hopwood, 1986a), son realmente bacterias gram positivas de alto contenido en G-C (Woese, 1987), cuyo hábitat natural es el suelo y cuyas características más relevantes son : (a) poseer un complejo ciclo celular, (b) biosintetizar una gran variedad de productos metabólicos, (c) su organización genómica y (d) poseer mecanismos específicos para la regulación de la expresión génica.

I.1.1.- Ciclo biológico de Streptomyces.

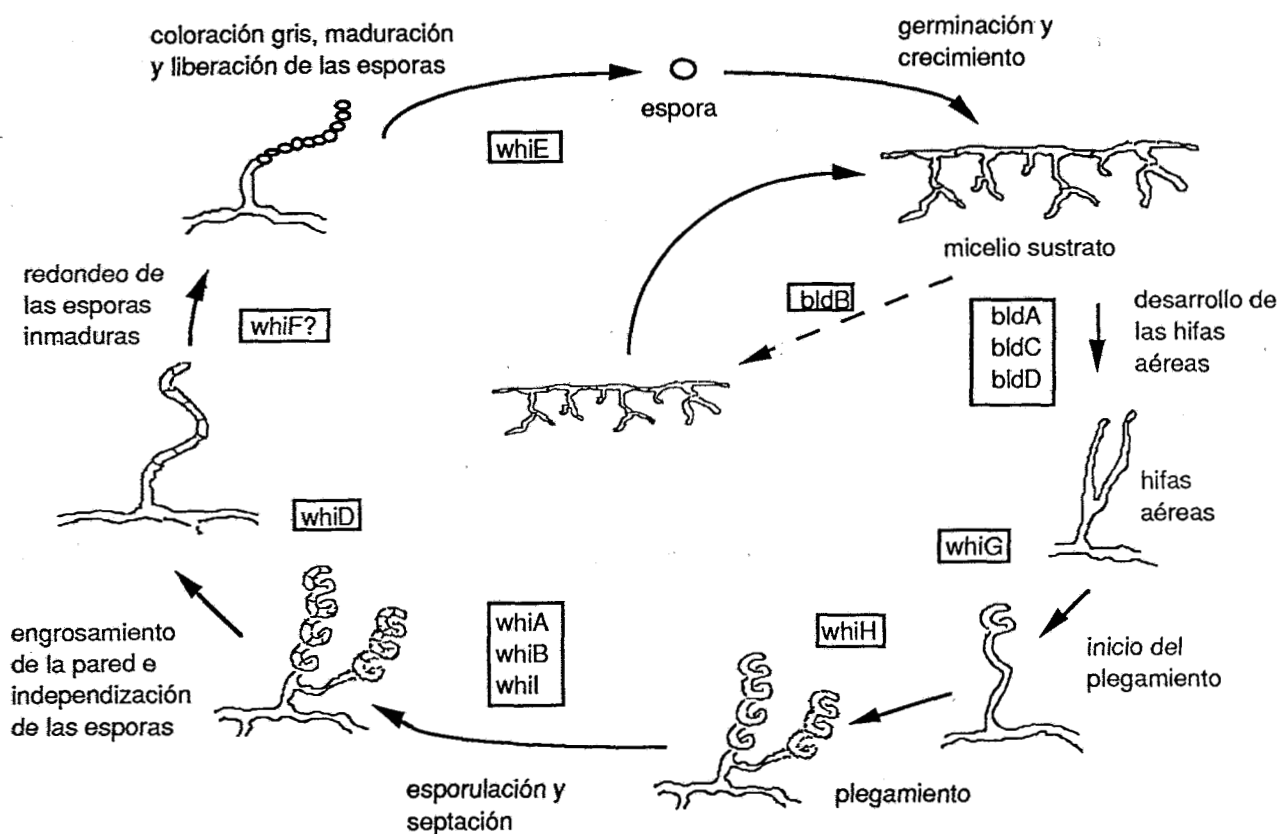
El ciclo biológico de los Streptomyces (fig.1, pag.2) comienza con la germinación de una espora, proceso durante el que se van disparando progresivamente los procesos metabólicos celulares aletargados (síntesis de RNA, síntesis de proteínas, etc.), a la vez que se degrada el material de reserva previamente almacenado. En aproximadamente dos horas comienza la síntesis de DNA y la formación del denominado tubo germinal, a partir del que se desarrolla el micelio sustrato como una compleja red de hifas. Este micelio sustrato, penetra y solubiliza los restos orgánicos del soporte en el que crece mediante la secreción de una enorme variedad de enzimas hidrolíticos (Chater, 1984).

El crecimiento de la colonia, determina una polaridad morfológica en la que se produce un gradiente de nutrientes desde el micelio sustrato hacia la región no anclada en el soporte. En un determinado momento de carencia nutritiva, la zona más alejada de la región receptora de nutrientes recibirá una señal que disparará la expresión de los genes implicados en la formación del micelio aéreo. Se ha especulado mucho sobre el tipo de señales que provocan este paso y se han tratado de asociar a altos niveles de nucleótidos cíclicos y nucleósidos polifosfato como ppGpp, sin descartar el papel que puedan desempeñar ciertos productos endógenos difusibles entre los que destaca el factor A (Horinouchi y col., 1983; Chater, 1989). Las hifas aéreas, de superficie hidrofóbica y quitinácea, se desarrollan nutriéndose parcialmente de los productos de la degradación del

micelio sustrato, y una vez formadas se pliegan, enrollan y subdividen en compartimentos; después de la subdivisión regular de las hifas aéreas, se produce la septación, dando lugar a las esporas, que se liberan al medio, cerrando el ciclo biológico. El resultado final son esporas morfológicamente semejantes a las de otros microorganismos, aunque en Streptomyces no parecen ser termoresistentes.

Algunos de los genes que intervienen en el ciclo celular de Streptomyces han sido caracterizados genética o físicamente. Por su relevancia para este trabajo, cabe citar : bldA, whiG y whiE (alelos determinantes de los procesos de diferenciación morfológica).

Fig. 1 - Ciclo biológico de Streptomyces *



* Los genes que controlan los distintos pasos aparecen enmarcados.

I.1.2.- Metabolismo en Streptomyces.

El metabolismo de Streptomyces es enormemente versátil y rico, lo que le permite producir una gran variedad de compuestos. Es por ello por lo que se han acuñado los términos metabolismo primario y metabolismo secundario. El denominado metabolismo primario, haría referencia a los procesos encargados de satisfacer las necesidades biológicas vitales de toda célula, como la síntesis de DNA, la síntesis de proteínas, etc. y el denominado metabolismo secundario describiría el conjunto de procesos que dan lugar a la producción de otros compuestos no implicados directamente en el mantenimiento celular básico y sin los que el organismo sigue siendo viable : los metabolitos secundarios.

Como exponente de la capacidad del género Streptomyces para producir gran cantidad de metabolitos secundarios de distinto tipo, cabe señalar la producción de más del 70% de los antibióticos conocidos (Tomick,1988; Hopwood,1989) además de otros compuestos como antiparasitarios (Ikeda y col.,1987), agentes antivirales (Sarin, 1988) y antitumorales (Strohl y col.,1989), herbicidas (Seto y col.,1983), amilasas (Long y col.,1987), proteasas (Henderson y col.,1987), nucleasas y un largo etc., que da idea de las posibilidades que abre su estudio, tanto a nivel básico como aplicado.

La producción de los denominados metabolitos secundarios en Streptomyces, tiene lugar siempre en el mismo momento del ciclo celular, después de un rápido crecimiento vegetativo y concomitante a determinados cambios morfológicos (Hopwood y col.,1986a).

I.2.- Organización génica en Streptomyces.

El cromosoma de Streptomyces sólo ha sido estudiado con cierta profundidad en una especie: S.coelicolor. Actualmente, se dispone de evidencias genéticas sobre su presunta circularidad en las especies analizadas (tabla 1, pag.4). La distribución de los genes mapeados, presenta una marcada polaridad en especies como S.coelicolor (Hopwood y col.,1986a) y S.bikiniensis var. zorbonensis (Coats y Roeser,1971), con dos regiones físicamente enfrentadas, en las que se localizan la gran mayoría de los genes mapeados, y otras zonas aparentemente sin marcadores (fig.2), aunque este fenómeno no es común a todas las especies analizadas (S.avermitilis, Ikeda y col.,1987; S.venezuelae, Vats y col.,1987). Así mismo, la posición relativa de los genes en el mapa genético parece conservarse en gran medida entre algunas especies como S.coelicolor, S.chrysomallus, S.rimosus y S.venezuelae, sugiriendo una relación más estrecha que la asignada por la taxonomía tradicional (Stuttard y col.,1987).

Fig. 2 - Mapa genético de S.coelicolor.
(De Hopwood y col., 1985a)

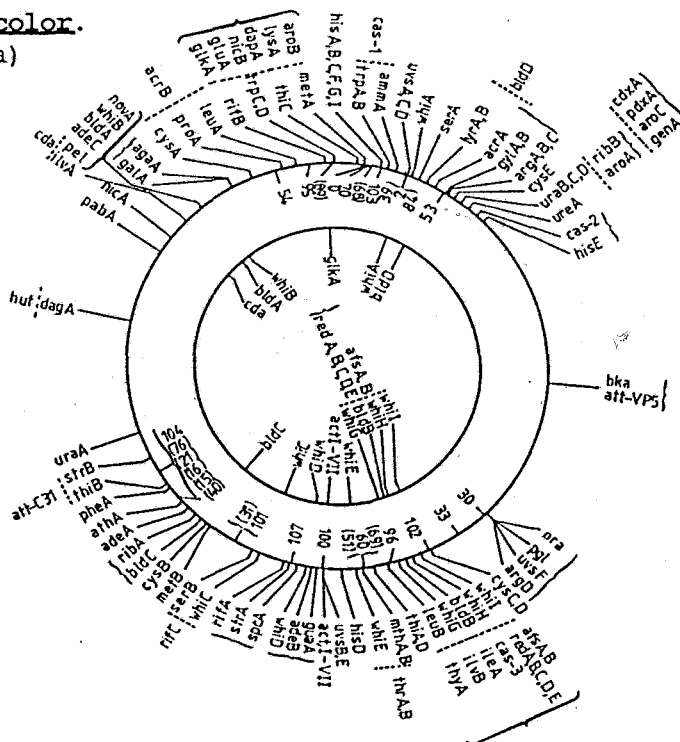


Tabla 1 .- Especies de Streptomyces con marcadores mapeados genéticamente.

<u>Especie</u>	<u>Referencia</u>
<u>S.coelicolor</u> A3(2)	Hopwood,1965
<u>S.glaucescens</u>	Hutter y col.,1981
<u>S.avermitilis</u>	Ikeda y col., 1987
<u>S.venezuelae</u>	Vats y col.,1987
<u>S.rimosus</u>	Friend y Hopwood,1971
<u>S.lividans</u>	Hopwood y col.,1983a
<u>S.achromogenes</u> var. <u>rubradiris</u>	Coats y Stroman,1971
<u>S.bikiniensis</u> var. <u>zorbonesis</u>	Coats y Roeser,1971
<u>S.chrysomallus</u>	Keller y col.,1985
<u>S.clavuligerus</u>	Kirby,1977
<u>S.griseus</u>	Parag,1979
<u>S.olivaceus</u>	Matselyuk,1976

El tamaño del genoma de este género había sido estimado en unas 9000 kb por experimentos de hibridación (Antonov y col.,1978), aunque recientemente, utilizando la electroforesis de campo pulsante, se ha fijado en aproximadamente 6500 kb (Hopwood, comunicación personal). Este tamaño, es del orden de dos veces el tamaño del genoma del microorganismo E.coli (Smith y col.,1987) o B.subtilis (Young y Wilson,1974), lo que supone una gran discrepancia que no parece estar justificada ni por la presencia de los genes implicados en la diferenciación morfológica ni por la información necesaria para la producción de metabolitos secundarios. Probablemente, unas pocas decenas de genes sería suficiente para almacenar la información implicada en la diferenciación morfológica (Young y Wilson,1974; Chater,1984), y 30-35 kb serían suficientes para los 15-30 genes implicados en la biosíntesis de un antibiótico (Hopwood y col.,1986a). De hecho, la bacteria gram positiva B.subtilis posee un ciclo biológico complejo, es productora de antibióticos, etc., y su genoma es de tamaño similar al de E.coli. La existencia de fenómenos de amplificación de regiones del DNA que llegan a estar presentes hasta en 250-300 copias en tándem (Schrempf,1985), podría, de alguna manera, dar cuenta de parte del tamaño excesivo del genoma de Streptomyces, a la vez que sugiere la existencia de regiones de DNA no codificantes (Robinson y col.,1981; Fishman y col.,1985), pero difícilmente justificaría varios miles de kb.

Una de las razones que se han postulado para explicar la presencia de regiones no codificantes en el cromosoma de Streptomyces, es que ésta podría estar relacionada con mecanismos de regulación de la expresión génica (Hopwood y col.,1986a). Sin embargo, no hay que olvidar la existencia de casos descritos de genes "silentes" en especies de Streptomyces que normalmente no se expresan pero que, bajo determinadas circunstancias, sí lo hacen (Jones y Hopwood,1984). Resulta interesante destacar la existencia de genes duplicados con la misma función aparente, entre los que quizás resulten más evidentes ciertos genes de resistencia a antibióticos que aparecen en varias copias dentro de la misma especie (Ohnuki y col.,1985a; Tohyama y col.,1987).

El mayor tamaño del genoma de Streptomyces respecto al de otros procariotas, es un hecho que en la actualidad no ha sido plenamente justificado.

Otro exponente de la complejidad de la organización génica en Streptomyces, lo constituye la presencia, en la mayor parte de las especies analizadas, de plásmidos de tamaño y número de copias muy variable (4-350 kb / 1-100 copias). Sin embargo, excepto SCP1, que lleva los genes implicados en la biosíntesis y resistencia del antibiótico metilenomicina (Kirby y Hopwood, 1977; Aguilar y Hopwood, 1982), las únicas propiedades que aparentemente proporcionan son las relacionadas con procesos de conjugación y fertilidad, funciones que requieren el concurso de pocos genes en Streptomyces (Hopwood y col., 1985b) por lo que otras funciones, si existen, de la mayoría de estos plásmidos son aún desconocidas.

Pese a estas peculiaridades en la estructura del genoma, los Streptomyces comparten con otros procariotas la tendencia de los genes implicados en una misma ruta o proceso bioquímico a estar agrupados en "clusters". En S.coelicolor, se ha demostrado en el caso de los genes que controlan el metabolismo del glicerol (Seno y col., 1984) y los que intervienen en la biosíntesis de antibióticos (tabla 4, pag.10). Sin embargo, también existen evidencias de situaciones intermedias, donde los genes que intervienen en una misma ruta bioquímica se encuentran en parte agrupados y en parte dispersos a lo largo del genoma, como es el caso de la ruta de biosíntesis de histidina (fig.2, pag.3), situación que se aproxima a la organización de algunos eucariotas como levaduras (Jones y Fink, 1982).

I.3.- Control de la expresión génica en Streptomyces.

La existencia de una expresión génica diferencial, tanto en el tiempo como en el espacio, determina la necesidad de un control de la expresión génica sumamente fino en el género Streptomyces. Genes como bldA o whiG sólo se expresan en un momento del ciclo celular y en una parte de la colonia, lo que hace postular la necesidad de señales que coordinen la conexión de procesos simultáneos como la diferenciación bioquímica y morfológica. Existen evidencias de que este control se realiza tanto a nivel de transcripción como a nivel de traducción (Westpheling y col., 1985; Lawlor y col., 1987; Martín y Demain, 1980), encontrando peculiaridades no descritas para otros microorganismos.

I.3.1.- A nivel de transcripción.

La RNA polimerasa de Streptomyces es similar en cuanto a estructura a las RNA polimerasas de procariotas (Chater y Cooper, 1975; Buttner y Brown, 1985) aunque presenta una heterogeneidad mayor que la de muchos de ellos (Westpheling y col., 1984; Buttner y col., 1988). La existencia de, al menos, cuatro factores σ descritos, refleja las posibilidades que, a este nivel, presenta la regulación de la expresión génica en este género (Hopwood, 1986a). La identificación del producto del gen whiG, cuya mutación detiene la diferenciación morfológica de las hifas aéreas, como un factor σ (Méndez y Chater, 1987; Chater y col., 1988b), supone una evidencia de la importancia de la regulación del ciclo biológico de Streptomyces a través del contacto promotor-RNA polimerasa.

La heterogeneidad en la RNA polimerasas que presentan los Streptomyces, es consistente con la gran heterogeneidad encontrada en las presuntas regiones promotoras de los genes caracterizados, que hacen inviable, por el momento, la obtención de secuencias consenso para promotores en Streptomyces. No obstante, es posible agruparlas en

dos tipos : las similares y las diferentes a las consenso para los promotores típicos en *E.coli* (tabla 2) (Hopwood y col.,1986a; Martín y Liras,1989). Esta diferencia, podría explicar por qué pocos genes de *Streptomyces* pueden expresarse en *E.coli* (Bibb y Cohen,1982; Hopwood y col.,1986a), mientras que varios genes de *S.marcescens*, *E.coli*, *B.licheniformis* o *B.subtilis*, todos ellos con secuencias similares a las consenso para *E.coli* (Hawley y McClure,1983), sí puedan expresarse en *S.lividans* (Bibb y Cohen,1982; Jaurin y Cohen,1984; Pulido y col.,1987). A este nivel, es interesante destacar (a) la existencia de genes cuya expresión es controlada por la acción de varios promotores (Smith,1985; Buttner y col.,1988; Narva y Feitelson,1990) y (b) la existencia de grupos de genes bajo el control de un solo promotor (Chater y Hopwood, 1988a). En relación al primer punto, es especialmente ilustrativo en *S.coelicolor*, el control de la expresión del gen *dagA* (agarasa) a través de varias secuencias promotoras dispuestas en tándem y reconocidas por distintos tipos de RNA polimerasas. Esta situación, permite distintos grados de expresión del gen implicado, en función de la/las RNA polimerasas que lo estuvieran transcribiendo (Buttner y col.,1988). Es fácil imaginar, por tanto, que el simple control sobre los factores σ determinaría el tipo de gen que se expresaría y el balance de esta expresión en cualquier momento del ciclo celular.

Tabla 2 .- Secuencias promotoras en *Streptomyces* .

Promotor	región -45 a -25		región -10	distancia al mRNA	Ref.
<i>E.coli</i>	TTGACA	17 pb	TATaAT		a
<i>B.subtilis</i>					
<i>gyIP1</i>	TTGAAG	17 pb	GAGACT	8 pb	b
<i>gyIP1</i>	TOGAAC	19 pb	TAGAGT	6 pb	b
'0.9kb'	TTGGCG	19 pb	TAGTGT	7 pb	b
<i>dagP1</i>	TTGTCA	18 pb	TAGCAT	7 pb	c
<i>strBP</i>	TGGACA	25 pb	TAGCCT	6 pb	d
<i>orfP1</i>	CTGGCA	18 pb	TAGCAT	7 pb	e
<i>pIJ101A</i>	TTGGCG	18 pb	CAGACT	7 pb	f
<i>pIJ101B</i>	TTGACA	17 pb	CAGTAT	?	f
<i>ermP1</i>	TGGACA	14 pb	TAGGAT	6 pb	e
<i>ermP2</i>	TTGAAG	18 pb	GAGGAT	6 pb	e
<i>Streptomyces</i>	TTGaca	18 pb	tAGgaT		
<i>aphP1</i>	CGAAAGGCGCGGAACGGCGT	12 pb	CATGAT	8 pb	g
<i>aphP2</i>	CGGTGGGGGATTCCGGGCGA	12 pb	CCATGT	8 pb	g
<i>tsrP1</i>	TTGCGGTCAGGGCAGOCAT	14 pb	AATACT	6 pb	g
<i>tsrP2</i>	GCTGACGCATCCAGAAAT	14 pb	AATACT	6 pb	g
<i>vphP1</i>	GCAGCGCGGTGTGGGCGCTG	7 pb	CCGGGGGAGOGA	6 pb	g
<i>endH</i>	ATTGACTGATTGA	7 pb	CCGGGGGCAGGG	7 pb	h

a) Hawley y McClure,1983

b) Smith,1985

c) Buttner y col.,1988

d) Distler y col.,1987

e) Bibb y col.,1985

f) Buttner y Brown,1985

g) Janssen y col.,1985

h) Westpheling y col.,1985

Además de la existencia de factores sigma específicos para determinados genes, cabe señalar, como otros factores implicados en el control de la transcripción en Streptomyces, la existencia de productos metabólicos difusibles de célula a célula que podrían activar la transcripción de determinados grupos de genes. Así, el factorA (fig.3, pag.9), una molécula muy pequeña producida por varias especies de Streptomyces, parece controlar en S.griseus tanto la esporulación como la producción de antibióticos. Mutaciones en el gen afsA, que codifica esta molécula, bloquean ambos procesos en tanto que la adición exógena de pequeñas cantidades del metabolito al medio, hacen recuperar el fenotipo perdido (Horinouchi y col.,1983; Horinouchi y col.,1988).

En cuanto a la parada de transcripción, las señales rho-independientes descritas en Streptomyces (Hopwood y col.,1986a; Hallam y col.,1988) son similares a las de otros microorganismos. La eficiente terminación de la transcripción de genes de Streptomyces por el terminador del colifago fd, supone una evidencia al respecto (Bibb y Cohen.,1982).

Es evidente, que el estudio del control de la expresión génica a nivel de transcripción en Streptomyces, requiere de más estudios para poder llegar a establecer estructuras consenso. Resulta obvio, por tanto, que a medida que se vayan analizando nuevos genes, tanto del metabolismo primario como del metabolismo secundario, será posible ir estableciendo ciertas conclusiones.

I.3.2.- A nivel de traducción.

En lo referente al inicio de traducción, cabe destacar primeramente que el extremo 3' del rRNA 16S de S.coelicolor, a través del que reconoce el mRNA (Bibb y Cohen,1982), es idéntico al de B.subtilis (McLaughlin y col.,1981). En general, se ha descrito que las bacterias gram positivas como Bacillus y Staphylococcus son mucho más exigentes en la homología ribosoma-sitio de unión del ribosoma al mRNA que Streptomyces o la gram negativa E.coli (Hopwood y col.,1986a). Un caso particular que, en este sentido, ilustra de nuevo la complejidad en la regulación de la expresión génica en Streptomyces es el representado por el gen aph, que determina la resistencia a neomicina en S.fradie, este gen tiene el promotor sobre el ATG inicio de traducción con lo que secuencias internas al gen estarían implicadas en la unión del ribosoma al mensajero (Calos,1978; Hopwood y col.,1986a).

El uso de tripletes para la iniciación de la traducción en Streptomyces, parece ser menos estricto que en otros organismos. Si E.coli, el microorganismo genéticamente mejor conocido, utiliza mayoritariamente ATG (97%), Streptomyces lo hace aproximadamente un 70%, utilizando alternativamente GTG (25%-30%) y minoritariamente otros como TTG (Hopwood y col.,1986a; Lewski y col.,1989; Este trabajo, sin publicar). Así mismo, el elevado contenido en G-C del genoma de Streptomyces (73%) (E.coli aprox. 49% y B.subtilis 43%) se refleja en el uso preferencial de codones con G o C en tercera posición, lo que determina que codones como TTA, ATA, AAA, etc., sean considerablemente poco usuales (tabla 3, pag.8). La regulación de la expresión génica a nivel de traducción mediante el uso de codones raros es una atractiva posibilidad en Streptomyces, posibilidad que es potenciada por la evidencia que aporta el gen bldA en S.coelicolor, cuyo producto génico parece especificar para el leucín-t-RNA que reconoce el codón TTA (Lawlor y col.,1987).

La mutación del gen bldA, bloquea la diferenciación del micelio sustrato a micelio aéreo, al mismo tiempo que la producción de los antibióticos actinorhodina, prodigiosina, metilenomicina y CDA. El mecanismo sugerido, se basa en la disponibilidad de leucin-t-RNA (TTA) para traducir los genes con codones TTA en su secuencia codificante.

Además del gen bldA, existe otra posible evidencia sobre el control de la expresión génica a nivel de traducción en Streptomyces: la expresión del fenotipo resistente a antibióticos de la familia MLS (macrolido-lincosamida-streptogramina). La traducción del mRNA del gen implicado, es aparentemente gobernada a través de un fenómeno de atenuación sobre su secuencia líder (Uchiyama y Weisblum, 1985; Kamimiya y Weisblum, 1988).

Tabla 3 .- Uso de codones de 63 genes de Streptomyces *

F	TTT	8	S	TCT	12	Y	TAT	21	C	TGT	20
F	TTC	560	S	TOC	410	Y	TAC	431	C	TGC	20
L	TTA	4	S	TCA	29	*	TAA	2	*	TGA	51
L	TTG	50	S	TOG	272	*	TAG	10	W	TGG	301
L	CTT	43	P	CCT	34	H	CAT	31	R	CGT	100
L	CTC	685	P	CCC	460	H	CAC	453	R	CGC	728
L	CTA	6	P	CCA	14	Q	CAA	34	R	CGA	62
L	CTG	989	P	CCG	558	Q	CAG	476	R	CGG	576
I	ATT	28	T	ACT	28	N	AAT	20	S	AGT	28
I	ATC	598	T	AOC	873	N	AAC	458	S	AGC	284
I	ATA	19	T	ACA	29	K	AAA	23	R	AGA	20
M	ATG	302	T	ACG	388	K	AAG	445	R	AGG	90
V	GTT	52	A	GCT	73	D	GAT	53	G	GGT	143
V	GTC	856	A	GOC	1512	D	GAC	1199	G	GGC	1132
V	GTA	31	A	GCA	106	E	GAA	215	G	GGA	165
V	GTG	600	A	GCG	855	E	GAG	940	G	GGG	330

* (D.A.Hopwood, comunicación personal).

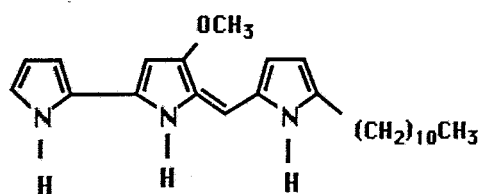
I.4.- S.coelicolor como modelo de estudio.

El gran desarrollo que en los últimos diez años ha sufrido la biología molecular en general y el estudio sobre Streptomyces en particular, ha posibilitado que actualmente dispongamos de los datos y herramientas necesarios (disponibilidad de vectores, desarrollo de técnicas, etc.) para la profundización en la biología de este género. Entre todas las especies de Streptomyces, sin duda es S.coelicolor A3(2), la que ha sido objeto de mayor número de estudios, por lo que ha alcanzado un desarrollo genético suficiente como para convertirse en una alternativa en la biología molecular de procariotas. Los más de 200 marcadores genéticos mapeados y la gran variedad de vectores disponibles, hacen posible abordar en ella gran número de problemas biológicos, especialmente los relacionados con la diferenciación celular y con la producción de metabolitos secundarios. Las ventajas que presenta S.coelicolor para el estudio del metabolismo secundario,

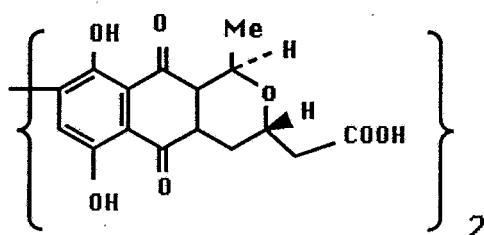
hace a esta especie particularmente indicada para la profundización en el análisis de la biosíntesis de antibióticos en Streptomyces, razón por la que el presente estudio se ha realizado sobre ella.

La especie S.coelicolor, posee un ciclo celular típico y produce, al menos, cinco metabolitos secundarios, cuatro de ellos con actividad antibiótica : actinorhodina, prodigiosina, metilenomicina y CDA (calcium dependent antibiotic) (fig.3) (Hopwood y Wright,1983b; Hopwood,1986a). El quinto, el factor-A (producto del gen afsA; fig.3), es una molécula sencilla, con un papel no aclarado en S.coelicolor (mutaciones que bloquean su síntesis no generan cambios fenotípicos apreciables), aunque sí es esencial para la producción de antibióticos y la diferenciación morfológica en S.griseus y S.bikiniensis (Horinouchi y col.,1983).

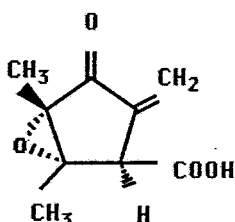
Fig. 3 - Metabolitos secundarios en S.coelicolor



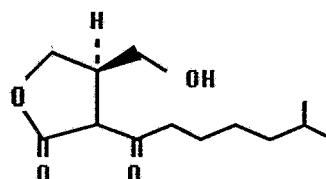
Undecilprodigiosina



Actinorhodina



Metilenomicina



Factor-A

Los antibióticos, a pesar de ser moléculas relativamente sencillas, requieren la intervención de 10-30 enzimas para su biosíntesis, lo que exige un alto grado de complejidad en la organización y expresión de los genes involucrados. Entre las características más relevantes de los genes implicados en la biosíntesis de antibióticos cabe destacar :

* Se encuentran agrupados formando "clusters", lo que puede facilitar su aislamiento y caracterización (tabla 4, pag.10).

* Se suelen encontrar genes que determinan la resistencia al antibiótico junto a los genes implicados en las etapas biosintéticas (tabla 4, pag.10).

* Un gen interno al "cluster" parece controlar la expresión de los genes biosintéticos. Su expresión parece estar controlada, a su vez, por otro/s gen/es ajenos al "cluster" (tabla 4, pag.10).

* Las regiones codificantes de genes bioquímicamente relacionados se encuentran conservadas en distintas especies, lo que sugiere un origen ancestral común.

* Algunos productos de genes de biosíntesis de antibióticos pueden reconocer metabolitos relacionados procedentes de otras rutas, produciendo compuestos nuevos.

Tabla 4 .- "clusters" de genes de antibióticos en Streptomyces.

<u>Antibiótico</u>	<u>Org.productor</u>	<u>a / b / c / d</u>				<u>Referencia</u>
Antraciclinas	S.peucetius S.galilaeus S. sp. C5	+	+	+	+	Stutz-Engwall y Hutchinson, in press ; Hutchinson, com.personal
Avermectinas	S.avermitilis	+				Ikeda y col.,1987
Actinorhodina	S.coelicolor	+	+	+	+	Wright y Hopwood, 1976 Malpartida y Hopwood,1984
Undecylprodigiosina	S.coelicolor	+	+		+	Rudd y Hopwood, 1980
Metilenomicina	S.coelicolor S.violaceusruber	+	+	+	+	Chater y Bruton,1985a
Eritromicina	Sac.erithraeae	+	+	+		Stanzak y col.,1986
Streptomycin	S.griseus S.glauscenscens	+		+	+	Ohnuki y col.,1985b
Tetracenomicina	S.glauscenscens	+	+	+		Motamedi y Hutchinson,1987
Granaticina	S.violaceusruber	+		+		Malpartida y col.,1987 Sherman y col.,1989
Oxitetraciclina	S.rimosus	+	+	+		Pigac y Alacevic,1979 Rhodes y col.,1981
Bialaphos	S.hygroscopicus	+	+	+	+	Anzai y col.,1987 Murakami y col.,1986 Thompson, com. personal
Puromicina	S.alboniger	+	+	+		Vara y col.,1988 Jiménez, com. personal

a) casos en que hay evidencias de genes agrupados

b) casos en que hay evidencias de estar el conjunto completo de genes en el "cluster"

c) casos en que hay evidencias de la presencia de genes de resistencia en el "cluster"

d) casos en que hay evidencias de genes reguladores en el interior del "cluster"

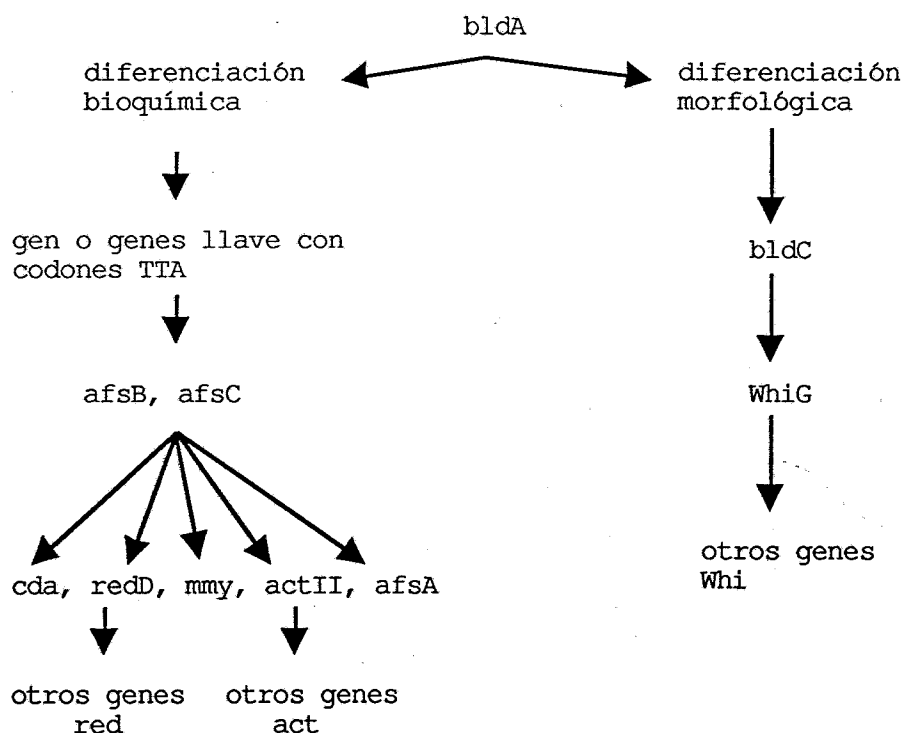
En el caso de S.coelicolor, se han clonado los genes implicados en la biosíntesis de varios antibióticos, como actinorhodina (Malpartida y Hopwood,1984), metilenomicina (Chater y Bruton,1985a) y prodigiosina (Feitelson y col.,1985; Malpartida y col.,submitted), y en todos los casos aparecen agrupados. El caso concreto de actinorhodina se ajusta a todos los supuestos sobre los genes de biosíntesis de antibióticos arriba señalados (Malpartida y Hopwood,1984; Malpartida y

Hopwood,1986) sin que haya evidencias de que no ocurra en los otros casos.

El hecho de que mutaciones puntuales en S.coelicolor afecten simultáneamente a la diferenciación morfológica y a la producción de antibióticos (gen bldA; Merrick,1976), y otras tan solo a la diferenciación morfológica (gen whiG; Méndez y Chater,1987) o a la producción de metabolitos secundarios (gen afsB, Horinouchi y col.,1983) sugiere la existencia de una cascada de señales reguladoras desde el metabolismo primario hacia el metabolismo secundario, tanto a nivel morfológico como bioquímico. Estas señales tendrían puntos en común, cuyo bloqueo abortaría ambos procesos, y puntos independientes, que determinarían, en caso de inactivación, la detención de tan solo uno de los procesos a partir del gen no funcional.

El presunto último escalón en la cascada de señales, inmediatamente anterior a los genes biosintéticos de antibióticos, sería el representado por el gen regulador que suelen presentar los "clusters" de biosíntesis de antibióticos, bien con función de activador, como en los sistemas actinorhodina (Malpartida y Hopwood,1986) y prodigiosina (Malpartida, submitted) o represor como en el caso de metilenomicina (Chater y Bruton,1985a). El bloqueo de estos genes sólo parece afectar a la expresión del "cluster" al que pertenecen. Así pues, los escalones hasta ahora identificados en la presunta cascada de señales que conduce a la producción de los antibióticos actinorhodina, prodigiosina y metilenomicina en S.coelicolor, serían cuatro : bldA > afsB > gen regulador interno > genes estructurales (fig.4).

Fig. 4 - Presunta cascada de señales reguladoras de la diferenciación en S.coelicolor (Hopwood y col.,1988a)

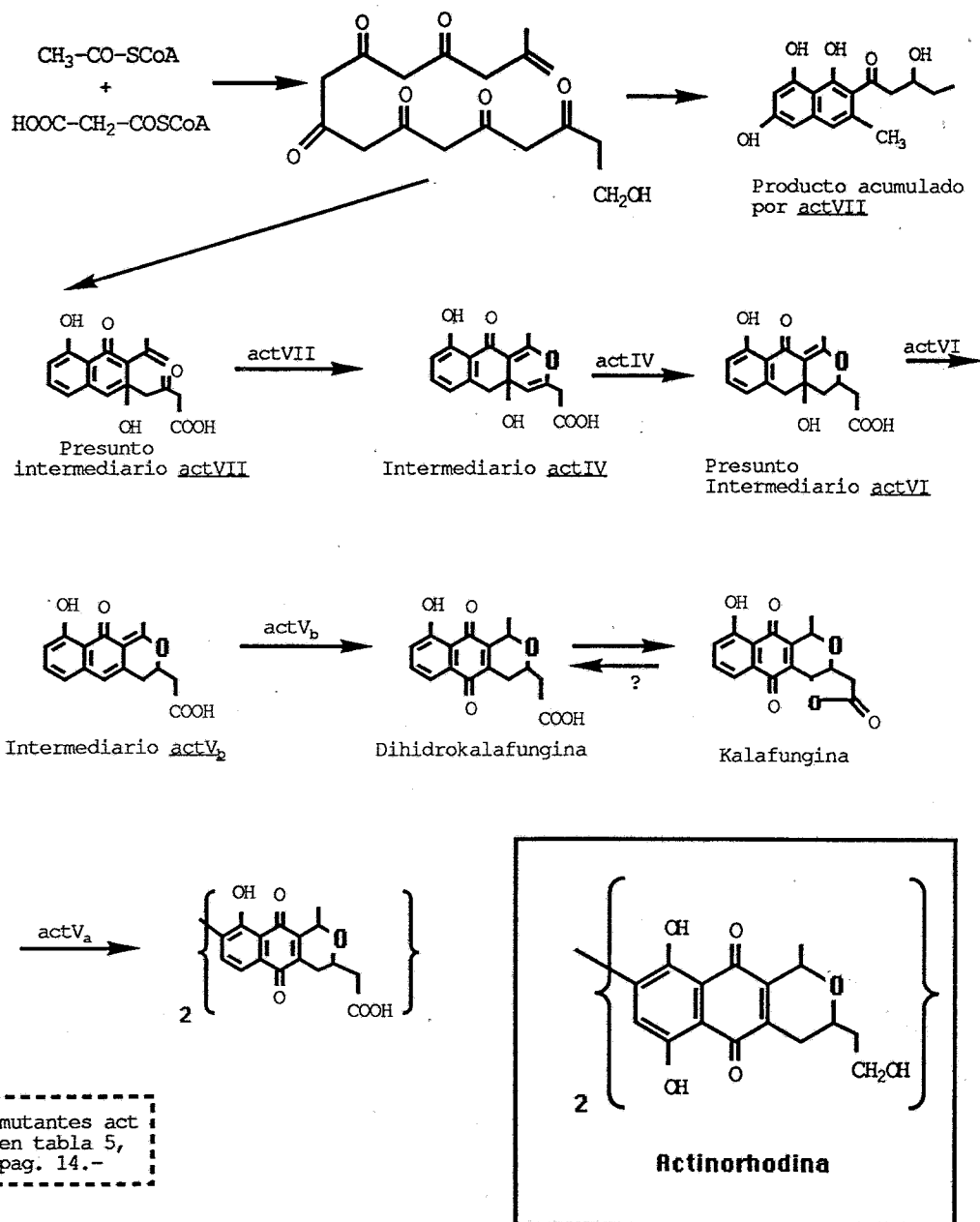


Las características hasta ahora señaladas, nos han llevado a considerar a S.coelicolor como la especie más adecuada del género para abordar el presente trabajo.

I.5.- Actinorhodina como modelo de estudio

Los esfuerzos realizados en este trabajo, se han centrado en el antibiótico actinorhodina producido por *S.coelicolor*. Miembro de la familia de los poliquétidos, la actinorhodina se sintetiza a partir de 8 unidades de acetatos (Gorst-Allman y col.,1981) que sufrirán sucesivas condensaciones hasta formar un esqueleto carbonado que, tras reacciones de óxido-reducción, ciclación y dimerización formará la molécula final del antibiótico (fig.5).

Fig. 5.- Hipotética ruta de biosíntesis de actinorhodina.
(de Floss y col.,1985)

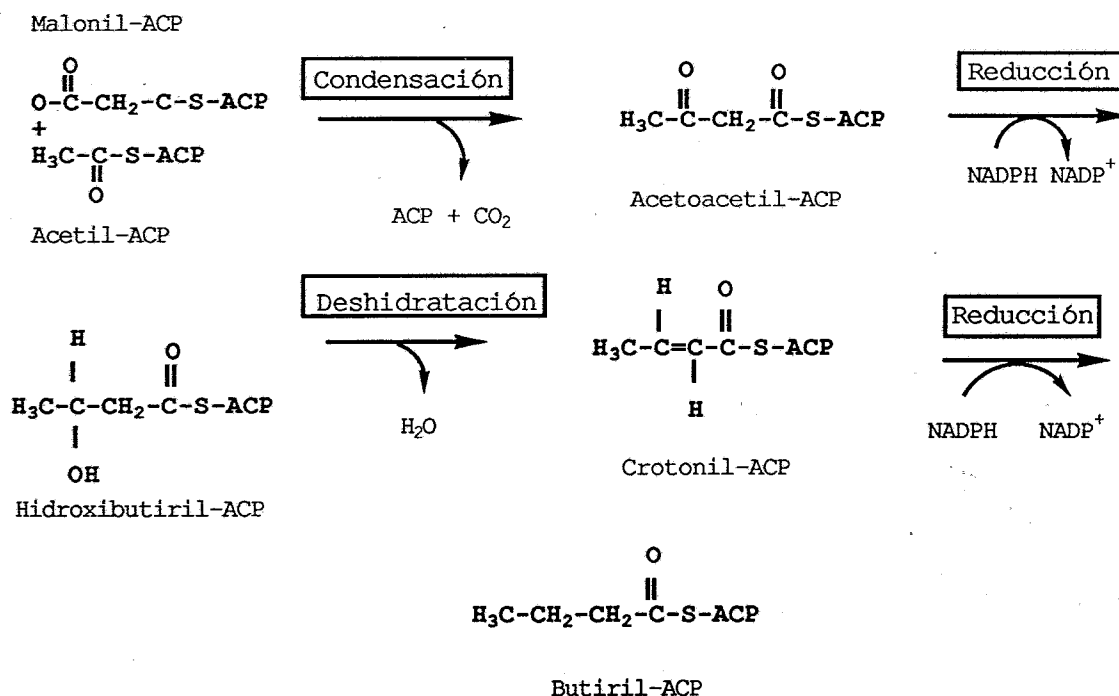


Los poliquétidos, son un gran grupo de compuestos producidos por actinomicetos, hongos y plantas superiores que tienen en común estar formados por condensaciones sucesivas de unidades de pocos átomos de carbono como acetato, propionato, butirato, etc. (Packter,1980). Uno de los aspectos más destacables de este tipo de moléculas, es la gran

variedad de ellas que poseen actividad antibiótica y que son utilizadas en medicina y otros campos. Entre estos compuestos, destacan : macrólidos (como tilosina, eritromicina, carbomicina y otros), antraciclinas (como daunorrubicina, tetracenomicina, doxorubicina, etc.), isochromanquinonas (como actinorhodina, granaticina y otros), tetraciclinas, etc. (Seno y col.,1989; Strohl y col.,1989). La profundización en los mecanismos de expresión de estos antibióticos parece, pues, relevante.

Las reacciones de ensamblaje que sufren las unidades de acetatos para formar la cadena carbonada básica en la estructura de los poliquétidos recuerda en gran medida a la biosíntesis de ácidos grasos (Lynen,1980), con ciclos de reacciones de condensación, reducción, deshidratación y nueva reducción (fig. 6). Estas cuatro reacciones básicas, sólo representan parte de las actividades de una ácido graso sintetasa, cualquiera que sea su origen. Además de ellas, las sintetasas de ácidos grasos requieren otras actividades enzimáticas como transferasas, tiolasas, etc., a las que en el caso de las sintetasas de poliquétidos hay que añadir ciclasas, metilasas y otras. El proceso de biosíntesis de la cadena poli-ceto de un antibiótico como actinorhodina presenta particularidades con respecto a la biosíntesis de ácidos grasos, pues la cadena creciente no sufre generalmente las cuatro reacciones comentadas, quedando saturada, sino que en algunos casos sólo sufre tres, dejando un doble enlace, en otros dos, dejando un hidroxilo, y en otros tan solo ocurre la condensación (fig.5, pag.12), todo ello en función del poliquétido a sintetizar.

Fig. 6.- Reacciones primarias en la síntesis de ácidos grasos.



Una sintetasa de este tipo es, pues, un sistema multivalente implicando, en principio, ocho unidades funcionales : proteína transportadora de acilos (ACP, que se encarga de presentar las unidades a condensar), acetil, malonil y "producto-final" transferasa (para poner en contacto los acilos con la ACP y para liberar el

producto final), y las mencionadas cetoacil sintetasa o enzima condensante, cetoacil reductasa, deshidratasa y enoil reductasa. La organización de estas actividades varía en función de su origen, desde un complejo multienzimático con subunidades que son productos de genes físicamente independientes (sintetasa tipo II, típico de procariotas) (Alberts y Greenspan, 1984) o una sola proteína multifuncional (sintetasa tipo I, típico de vertebrados) (Hardie y McCarthy, 1986).

Pese a ello, las etapas bioquímicas que conducen a la biosíntesis de actinorhodina resultan aún oscuras. La ruta biosintética, pese a su caracterización genética (fig.5, pag.12; tabla 5), contiene aún numerosas lagunas que se pretenden reducir mediante estudios básicos de caracterización molecular de los genes implicados.

Al comenzar este trabajo, el "cluster" de genes implicados en la biosíntesis de actinorhodina había sido clonado y se habían identificado cuatro unidades de transcripción, policistrónicas y monocistrónicas (fig.7, pag.15) (Malpartida y Hopwood, 1986). Se habían estructurado a nivel físico las clases fenotípicas descritas previamente a nivel genético (Rudd y Hopwood, 1979, tabla 5) y se habían agrupado los distintos genes en grupos de actuación temprana en un extremo del "cluster" y de acción tardía en el otro, con una región central reguladora (Malpartida y Hopwood, 1984; Malpartida y Hopwood, 1986) (fig.7, pag.15).

Tabla 5.- Clases de mutantes act*

clase	nº	act. biológica ^a	experimentos de cosíntesis	
			convertidor de clases	secretor a clases
II	26	-	-	-
I	13	-	IV,V,VI,VII	-
III	7	-	IV,V,VI,VII	-
VII ^b	2	(+)	?IV,V,VI	I,III
IV	5	-	V,VI	I,III, (?VII)
VI	2	-	V	I,III,IV, (?VII)
V	21	+	-	I,III,IV, (?VII)

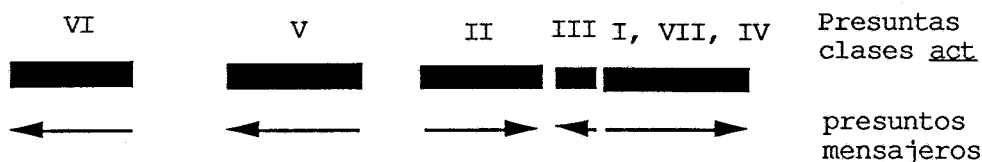
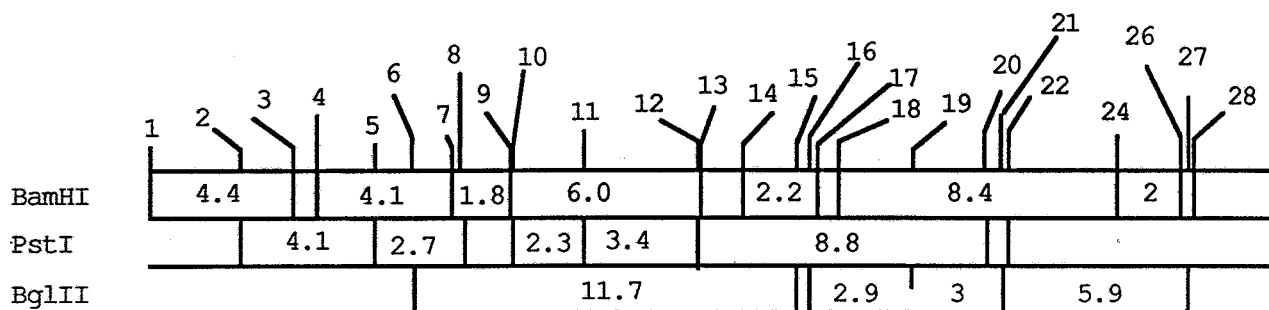
a) anti Staphylococcus aureus

b) ambos mutantes producían pequeñas cantidades de actinorhodina, lo que generó una limitada inhibición del crecimiento de Staph.aureus y cierta confusión sobre la polaridad de las reacciones de consíntesis.

* De Rudd y Hopwood, 1979.

Creemos que las características presentadas por el "cluster" biosintético de actinorhodina : (i) la semejanza en los primeros pasos de su ruta de biosíntesis con la biosíntesis de ácidos grasos, (ii) la disponibilidad de los genes de su ruta de biosíntesis en un fragmento de 25 kb, (iii) la avanzada caracterización genética y transcripcional de la ruta y (iiii) el ser producida por la especie genéticamente mejor conocida del género, junto con la trascendencia que tiene conocer en detalle los sistemas de expresión de los poliquétidos, hacen de este antibiótico un excelente modelo de estudio.

Fig. 7 - Organización estructural del cluster act al comienzo del trabajo.



I.6.- Streptomyces : presente y perspectivas.

Como se deduce de lo que hemos expuesto hasta ahora, los Streptomyces constituyen un género bacteriano de excepcional valor, tanto como objeto de estudios básicos como de herramienta para obtener un gran número de compuestos socialmente útiles. Su característico ciclo biológico hace que la profundización en los procesos evolutivos que han dado lugar a su morfología y a la diversificación de sus rutas metabólicas, sea un desafío para los estudiosos de los fenómenos de diferenciación. Del mismo modo, el aumento y la mejora de las posibilidades industriales que nos ofrecen suponen un estímulo poderoso para su estudio.

La relativamente reciente atención que a nivel científico se ha puesto en el género Streptomyces, hace que exista un gran número de puntos oscuros sobre su biología y posibilidades. La complejidad que presentan en la regulación a nivel de transcripción y los tremendamente escasos datos aportados sobre el control de la traducción, convierten su estudio en un reto, que, unido a su indudable proyección social, hace de ello una necesidad.

A pesar de la relativa escasez de datos, actualmente disponemos de un gran número de medios para profundizar en la biología de los Streptomyces. El conocimiento a nivel genético de la especie S.coelicolor y los datos sobre su biología nos permite abrigar grandes esperanzas sobre la pronta comprensión de muchos procesos aún oscuros. Así mismo, la capacidad de producir antibióticos que posee esta especie, nos va a proporcionar los sistemas necesarios donde analizar

tanto la organización física y la regulación de genes de biosíntesis de poliquétidos como las conexiones existentes entre el metabolismo primario y el secundario, así como las posibilidades de manipulación dirigida "in vitro" de los genes biosintéticos de estos antibióticos. Además de todo ello, la asociación temporal entre la diferenciación morfológica y la diferenciación bioquímica que presentan los Streptomyces, parece sugerir la existencia de elementos reguladores comunes a ambos procesos (Hopwood, 1988a; Hopwood, 1988b) cuya comprensión se ha convertido en un nuevo reto para numerosos grupos de investigación en el campo de los actinomicetos. Sin duda, la mayor comprensión de esas relaciones conducirán a un proceso racional de mejor utilización de los recursos que nos ofrecen.

Este ha sido, fundamentalmente, el planteamiento que nos ha movido a lo largo de este trabajo.

I.7.- Biotecnología de antibióticos y futuro.

Las posibilidades industriales de la obtención de antibióticos a partir de los organismos productores ha hecho que el estudio de estos organismos se haya centrado en la mejora de la productividad, y se haya traducido en la optimización de los procesos fisiológicos de producción y de los dispositivos físicos de fermentación. Ello, ha dejado un poco de lado los aspectos básicos de los mecanismos de producción de antibióticos, el entender por qué ocurren las cosas además de para qué sirven, olvidando quizás, que en la investigación biotecnológica, el estudio de los aspectos básicos está estrechamente unido a la investigación aplicada. La comprensión de un proceso siempre será el primer paso para su manipulación controlada.

En este sentido, los esfuerzos científicos en la biotecnología de antibióticos están orientados hacia diferentes objetivos :

- * La búsqueda continua de antibióticos no conocidos. En este campo, destaca la persecución de nuevos métodos de detección de organismos productores desconocidos (fruto de la cual ha sido el descubrimiento de aricidinas en Kibdelosporangium, Sitrin y col., 1985) y de chequeo de la eficacia de nuevos compuestos, especialmente en el terreno de los agentes antivirales y antitumorales y de protección vegetal.

- * La modificación de los antibióticos conocidos. El objetivo en este punto es la búsqueda de un aumento de su eficacia o de la disminución de efectos secundarios (algunas antraciclinas utilizadas como agentes antitumorales tienen efectos cardiotóxicos, Strohl y col., 1989). Entre los medios de modificación de antibióticos en los que se está trabajando destacan (i) la modificación química, como en el caso del antiparasitario vegetal ivermectina, resultado de la hidroxilación de avermectinas naturales (Campbell y col., 1983), (ii) la modificación de las condiciones nutricionales para dirigir rutas fermentativas hacia la formación de los productos deseados (Huber y col., 1986) y (iii) la manipulación de genes de rutas biosintéticas que generen productos metabólicos nuevos (Hopwood y col., 1985c; Hopwood, 1989).

- * La búsqueda de nuevas moléculas que, asociadas a los antibióticos, puedan permitirles eludir los mecanismos de resistencia de microorganismos patógenos. Es ilustrativo de este punto el caso del ácido clavulánico, que acompaña a distintas penicilinas, actuando como diana de las β -lactamasas, impidiendo así la acción de éstas sobre el antibiótico (Brown y col., 1976).

* La manipulación genética de los organismos productores de antibióticos buscando la expresión de genes "silentes" o de superación de cuellos de botella metabólicos. En este punto, cabe destacar como ejemplo, que la transformación de S. lividans con DNA sin aparente información estructural de la ruta de actinomicinaD, tenga como resultado la detección de enzimas específicas de esta ruta que antes no aparecían (Jones y Hopwood, 1984).

* La búsqueda de antibióticos híbridos entre dos ya conocidos. Hasta el momento, los esfuerzos en este campo se centran (a) en la conjugación de cepas productoras buscando el enlazamiento espontáneo de rutas diferentes y (b) en una búsqueda más dirigida, clonando fragmentos de rutas de un antibiótico en cepas productoras de antibióticos relacionados (Hopwood y col., 1985c; Epp y Schoner, 1988; Hopwood, 1989)

El uso extensivo que se hace de los antibióticos y la gran capacidad adaptativa de algunos microorganismos, hace que las resistencias de éstos a los antibióticos se desarrollen rápidamente. Los esfuerzos de las investigaciones en el campo de los antibióticos y sus productores será uno de los caminos para mantenernos un paso adelante en el control de los microorganismos patógenos.

II.- OBJETIVOS

Como se desprende del capítulo anterior, existen numerosos interrogantes en los mecanismos de control de la expresión génica en Streptomyces, especialmente en el denominado metabolismo secundario. En un intento de aproximarnos a esos mecanismos, hemos elegido como modelo a S.coelicolor y como sistema la biosíntesis del antibiótico poliquétido actinorhodina.

Al comienzo de este trabajo, nos fijamos como objetivos :

- 1) Caracterización física de los genes implicados en las primeras etapas de biosíntesis de actinorhodina y deducir su función dentro de la ruta.
- 2) Caracterización a nivel molecular de la región del cluster act presuntamente implicada en la regulación de la expresión de los genes biosintéticos
- 3) Determinación de los factores que controlan la expresión del gen/es interno/s al cluster implicado en la activación de los genes biosintéticos.
- 4) Caracterización de secuencias pleiotrópicas capaces de activar los genes del cluster y que pudieran constituir un nexo entre la biosíntesis de antibióticos y otros procesos metabólicos.
- 5) Elaborar un modelo biosintético y de regulación que pudiera servir de base en un análisis comparativo con otros sistemas de biosíntesis de antibióticos.
- 6) A través del conocimiento de la estructura física del cluster act, abrir el camino hacia la manipulación "in vitro" de los genes del sistema.

III.- MATERIALES Y METODOS

III.1.- Productos Químicos

En general se han utilizado reactivos procedentes de las firmas Merck, Sigma, Boehringer, Probus, Carlo Erba y Pharmacia.

III.2.- Productos radiactivos

Todos los productos radiactivos utilizados en este trabajo fueron adquiridos a The Radichemical Center, Amersham.

III.3.- Enzimas

Las enzimas utilizadas en la manipulación de ácidos nucleicos han procedido de las casas comerciales Boehringer, Pharmacia, Biotech, Amersham y New England Biolabs.

III.4.- Cepas bacterianas utilizadas

III.4.1.- Streptomyces

<u>Cepa</u>	<u>Alelos mutantes y status plasmídico</u>	<u>refer.</u>
-------------	--	---------------

Derivados de *S.coelicolor* A3(2)

M145	SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ .	John Innes wild-type
B140	hisA1, uraA1, strA1, actVII-240, SCP1 ⁻ , SCP2 ⁺	Rudd y Hopwood, (1979)
JF4	proA1, argA1, uraA1, strA1, redE-60, actV _A -109, SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ .	Feitelson y Hopwood, (1983)
JF1	argA1, guaA1, redD-42, actII-177, SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ .	"
J1501	hisA1, uraA1, strA1, SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , øC31 ^s .	Chater y col., (1982)
J1507	hisA1, uraA1, strA1, SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , øC31 ^s , bldA.	Colección John Innes
B385	proA1, argA1, redE-60, SCP1 ⁻ , SCP2 ⁺	Rudd, B.A.M., (1978)
B43	hisA1, uraA1, strA1, SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , actII ⁻	"
B44	hisA1, uraA1, strA1, SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , actII ⁻	"
B58	hisA1, uraA1, strA1, SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , actII ⁻	"

Derivados de *S.lividans* 66

1326	SLP2 ⁺ , SLP3 ⁺ .	John Innes wild-type
TK21	SLP2 ⁻ , SLP3 ⁻ .	Hopwood y col., (1983)

III.4.2.- E.coli

<u>Cepa</u>	<u>Genotipo</u>	<u>Ref.</u>
JM101	supE, Thi, Δ (lac-proAB) [F', traD36, proAB, lacI ^q , ZAM15]	Messing y col., 1979
XL1-blue	recA1, endA1, gyrA96, Thi, hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁻), supE44, rdA1, lac-, (F', proAB, lacI ^q , ZAM15, Tn10-Tet ^R)	Bullock y col., 1987
GM242	dam ⁻³ , recA, sin ⁻² , Thr ⁻¹ , leuB, proA2, his ⁻⁴ , metB, Thi ⁻¹ , lacY, galK, ara ⁻¹⁴ , rpsL.	Arraj y Marinus, 1983

III.5.- Lista de plásmidos y fagos utilizados

III.5.1.- Streptomyces

<u>Plásmido</u>	<u>Características</u>	<u>Referencia</u>
pIJ486	Alto n° de copias; ts ^r ; con gen neo ^r sin promotor para ensayo de promotores.	Ward y col. (1986)
pIJ487	pIJ486 con polilinker en orientación invertida	"
pIJ940	Bajo n° de copias; derivado de SCP2*; con genes ts ^r e hyg ^r .	Lydiat y col. (1985)
pIJ941	Bajo n° de copias; derivado de SCP2*; con genes ts ^r e hyg ^r .	"
pIJ4083	Derivado del pIJ486 por inserción del gen XylE para ensayo de promotores.	K.Chater, comunic. personal
pIJ2343	fragmento smas clonado en pIJ486	F.Malpartida, com.personal

<u>Fago</u>	<u>características</u>	<u>fago parental/referencia</u>
φC31	fago salvaje	Lomovskaya y col., 1972
PM1	derivado att ⁻ de φC31; ts ^r , hyg ^r	φC31/Malpartida y Hopwood, 1986
KC515	derivado att ⁻ de φC31; ts ^r , hyg ^r	φC31/Rodicio y col., 1985
KC516	derivado att ⁻ de φC31; ts ^r , hyg ^r	φC31/Rodicio y col., 1985

III.5.2.- E.coli

<u>Plásmido</u>	<u>Características</u>	<u>Replicón</u>	<u>Referencia</u>
pIJ280	Kn ^r / Amp ^r	pMB8	Colección John Innes.
pGA46	Cm ^r ; con gen de Tc ^r para chequeo de promotores	p15A	Gynheung y Friesen, 1979
pBR329	Cm ^r , Ap ^r y Tc ^r	pMB8	Covarrubias y col., 1986
pUC18	Ap ^r , Bgal	"	Yanisch-Perron y col., 1985
pUC19	Ap ^r , Bgal	"	Yanisch-Perron y col., 1985
pIJ2921	Ap ^r , Bgal. Polilinker flanqueado por BglIII	"	Colección John Innes.
pIJ2325	coords. 6-15, fig.6	pIJ280	Malpartida y Hopwood, 1986

<u>Fago</u>	<u>Referencia</u>
M13mp18	Yanisch-Perron y col., 1985
M13mp19	Yanisch-Perron y col., 1985

III.6.- Medios de cultivo.

III.6.1.- E.coli

LB : Bactotripton 1%. Extracto de levadura 0.5%. Cloruro sódico 0.5%. (Maniatis y col. 1982)

M9 : PO₄HNa₂ 0.6%, PO₄H₂K 0.3%, ClNa 0.05%, ClNH₄ 0.1%. Ajustar el pH a 7.4 y esterilizar. Cuando está frío añadir SO₄Mg 2mM final, glucosa 0.2% final y Cl₂Ca 0.1 mM final. (Miller 1972).

TSB : LB pH6.1, 10% PEG (Pm 3350), 5% DMSO y 20mM Mg²⁺ (10mM Cl₂Mg + 10mM SO₄Mg). Esterilizar por filtración. (Chung y Miller, 1988)

Para la preparación de medios sólidos, LB y M9, añadíamos agar al medio descrito hasta 1.5%.

III.6.2.- Streptomyces

Medio mínimo : SO₄(NH₄)₂ 0.05%, PO₄HK₂ 0.05%, SO₄Mg.7H₂O 0.02%, SO₄Fe.7H₂O 0.001%, pH 7.2. Tras esterilizar, se añade Manitol estéril hasta 0.5%. (Hopwood, 1967).

Para medio sólido, añadir agar* hasta 2.2%.

R2YE o R5 : Sacarosa 10.3%, SO_4K_2 0.025%, $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.012%, glucosa 1%, casaminoácidos (DIFCO) 0.01%, extracto de levadura 0.5% tampón TES 0.573%, elementos traza 0.2%. Ajustar a pH 7.3 , añadir agar* hasta 2.2% y esterilizar.

Al utilizar, completar hasta POH_2K 0.005%, $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20mM, L-Prolina 0.3% y NaOH 7mM. (Thompson y col., 1980).

DNB : DIFCO NUTRIENT BROTH 0.8%. (Hopwood y col., 1985a)

DNA : DNB, glucosa 0.5%, agar 1.5%. Esterilizar y añadir $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ hasta 0.8mM y SO_4Mg hasta 1mM (en el caso de fagos derivados de ϕC31). (Hopwood y col., 1985a)

SNA : DNB con agar al 0.6%. (Hopwood y col., 1985a)

YEME : Extracto de levadura 0.3%, extracto de malta 0.3%, bactopectona 0.5%, glucosa 1% y Sacarosa 10.3%. Esterilizar y completar con $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ hasta 5mM. Para la preparación de protoplastos añadir, además, glicina hasta 0.5%. (Hopwood y col., 1985a)

SY : Almidón soluble 1.5%, extracto de levadura 0.1%, ClNa 0.3%, PO_4HK_2 0.1%, $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% y TES 20 mM. pH 7.4. Si se desea hacer con soporte sólido se le añadió agar al 1.5% final (Cole, S. comunicación personal).

HCM : (Hirsch Complex Medium). SO_4Mg 0.1%, Cl_2Ca 0.002%, Tris.ClH pH 7.3 0.1 M, Tritón X-100 0.001%, extracto de levadura 1% y casaminoácidos 1%. (C.Hirsch, comunicación personal).

* En aquellos medios en los que se requería bien regenerar protoplastos, bien una buena esporulación, se hacía imprescindible la utilización de agares específicos. De entre los analizados en el laboratorio sólo dieron buenos resultados "agar USP granulated" de la Nutritional Biochemicals Corporation y el agar bacteriological nº1, code L11 de Oxoid.

III.7.- Soluciones y tampones

Entre las de uso más cotidiano caben destacar

TE : (Tris 10mM pH 8, EDTA 1mM). Para resuspensión de DNA.

LA1 : Tris.ClH 25 mM pH8, EDTA 25 mM, Sacarosa 10.3%. Para resuspender células a lisar en extracciones de DNA por lisis alcalina.

LA2 : NaOH 0.3M, SDS 2%. Para lisis celular en extracciones de DNA por lisis alcalina.

TBE : (Tris 89 mM pH 8.3, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM). Para electroforesis.

SSC : (ClNa 150mM, citrato sódico 15 mM, pH 7.6) y Denhart (BSA 0.02%, ficoll 0.02%, PVP 0.02%) para transferencia e hibridación de ácidos nucleicos.

Elementos traza : (Cl_2Zn 0.004%, $\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, $\text{Cl}_2\text{Cu} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001%). Para medios y tampones de *Streptomyces*. (Hopwood y col., 1985a)

P : Sacarosa 10.3%, SO_4K_2 0.25%, $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.02%, elementos traza 2%. Esterilizar y añadir POH_2K hasta 0.005%, $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{HO}$ hasta 25 mM y tampón TES hasta 25 mM. Para manejo de protoplastos. (Hopwood y col., 1985a)

III.8.- Conservación y selección de cepas

Para la conservación de las cepas de E.coli se partía de un cultivo proveniente de una colonia aislada y crecido hasta una D.O. de 0.9-1 aproximadamente. Las células se recogían por centrifugación y se resuspendían en glicerol-peptona (50% glicerol, 50% bactopectona 1.5%). Finalmente, se guardaban a -20°C .

La conservación de las cepas de Streptomyces se realizó en forma de esporas (o de micelio en el caso de mutantes en esporulación) en glicerol al 20% y a -20°C . (Hopwood y col.1985a)

La selección de cepas bacterianas se realizó añadiendo a los medios de cultivo diferentes antibióticos en las condiciones que señala la siguiente tabla : (unidades en microgramos/ mililitro)

	<u>Streptomyces</u>			<u>E.coli</u>
	M.líquido	M.sólido completo	M.mínimo sólido	
Ampicilina	-	-	-	200
Cloramfenicol	-	-	8	25
Higromicina	50	200	50	50
Streptomycin	20	50	50	20
Tetraciclina	-	-	-	5-10
Thioestrepton	5	50	50	-

III.9.- Preparación de organismos y fagos

III.9.1.- Streptomyces

III.9.1.1.- *Suspensión de esporas*

Para la preparación y almacenaje de las cepas se preparaba una suspensión de esporas como describe Hopwood y col. (1985a).

III.9.1.2.- *Preparación de micelio*

Para las extracciones de ácidos nucleicos se partió de aproximadamente 1-2 grms (peso húmedo) de micelio, preparado según describe Hopwood y col.(1985a).

III.9.1.3.- *Pregerminación de esporas*

Este proceso se realizaba para obtener micelio crecido en tan solo 20-24 horas.

Para pregerminar las esporas, se recogían éstas por centrifugación y se lavaban con agua destilada. Tras resuspenderse en 10 ml de HCM (ver medios de cultivo), se agitaban durante 6-8 horas a 30°C hasta que se podía apreciar en el microscopio la aparición del tubo germinal. Se centrifugaba y resuspendía el sedimento en 2 ml de agua destilada estéril. Los cultivos se inoculaban con las esporas pregerminadas hasta obtener una D.O (450 nm) de 0.05-0.1. (Para

alcanzar esa D.O. se necesitan aproximadamente las esporas de 1-2 placas bien esporuladas por cada 100 ml de cultivo).

III.9.1.4.- Preparación de protoplastos

La preparación de protoplastos se basó en el trabajo de Okanishi y col. (1974) adaptado y optimizado por Bibb y col. (1978) y Thompson y col. (1982).

Un compendio de estos métodos es descrito por Hopwood y col. (1985a).

III.9.1.5.- Preparación de fagos: aislamiento y conservación.

Para la preparación y conservación de fagos de Streptomyces, se siguió exactamente el protocolo descrito por Hopwood y col. (1985a), tanto en el caso de partir de una suspensión de fagos anterior como de células lisogenizadas o de ufp's resultado de transfectar protoplastos con DNA del fago.

III.9.1.6.- Obtención de lisógenos.

El procedimiento para obtener lisógenos en Streptomyces (cepa con un DNA de fago insertado en el cromosoma) se realizó de acuerdo con Hopwood y col. (1985a).

Este tipo de técnica fue especialmente útil en el caso de mutagénesis dirigida (por inserción inactivante) y para localizar mutaciones por complementación.

III.9.2.- E.coli

III.9.2.1.- Preparación de células competentes

Se llevó a cabo siguiendo bien el método descrito por Brown y col. (1979) basado en el tratamiento con Cl_2Ca , o bien el descrito por Chung y Miller (1988), basado en el tratamiento con TSB.

III.9.2.2.- Preparación de fagos. Conservación

Para el trabajo con los derivados del colifago M13 se utilizaron básicamente las cepas JM101 y XL1 blue. El método seguido fue el descrito por Messing (1983) y Sambrook y col. (1989). El rendimiento final, era de aproximadamente 10^{11-12} u.f.p./ml.

La suspensión de fagos así obtenida se mantenía varios meses a 4°C.

III.9.3.- OTROS

En los experimentos para ensayar la actividad biológica de actinorhodina (aptdo. III.14.), se utilizaron los microorganismos B.subtilis y M.lúteus.

En el caso de M.lúteus, se crecía en medio LB a 37°C durante la noche para conseguir un cultivo en fase estacionaria.

En el caso de B.subtilis se partía de una suspensión de esporas de la que se retiraba una alícuota que se trataba 5' a 70°C para eliminar restos de forma vegetativa. Seguidamente, se crecía en medio LB a 37°C durante la noche.

III.10.- Obtención de DNA

Tanto en las extracciones de DNA de E.coli como de Streptomyces se seguía el mismo protocolo con la diferencia del tratamiento con lisozima previo a la lisis, inexistente en el primer caso y de 30'/37°C / 50 mg/ml en el segundo.

III.10.1.- Minipreparaciones de plásmidos

Se seguía el método descrito por Birnboim (1983) de lisis alcalina con las siguientes modificaciones en las proporciones :
Resuspensión del sedimento celular en 10% volumen de cultivo inicial (V_0) de LA1. Lisis celular con un 6% V_0 de LA2.
Precipitación de proteínas con un 8% V_0 de AcK 3M pH 6.
Fenolización con un volumen de fenol/cloroformo (50:50) pH 6.

III.10.2.- Preparación de DNA en gradientes de densidad de ClCs.

El volumen cultivo de partida era de 250-500 ml para E.coli y de 1 a 2 litros para Streptomyces en función del número de copias del plásmido a extraer.

El protocolo seguido era el mismo que para las minipreparaciones pero tras la precipitación con etanol se resuspendía en 8 ml de TE, se añadía ClCs hasta 1.05 grm/ml y BrEt hasta 625 µg/ml y se ultracentrifugaba 45K/6h; 38K/5h. Los pasos posteriores de purificación se realizaban según Maniatis y col.(1982) pero utilizando isopropanol saturado con ClNa para retirar el BrEt y diluyendo y precipitando con etanol en lugar de dializar.

III.10.3.- Preparación de DNA cromosómico de Streptomyces.

Para extraer DNA total de micelio de Streptomyces, se siguió el método descrito por Hopwood y col.(1985a), partiendo aproximadamente de 1 grm. de micelio.

III.10.4.- Preparación de DNA de fagos de Streptomyces.

Tanto para la obtención de grandes cantidades de DNA de fagos por gradiente de densidad de ClCs como para las minipreparaciones, se siguió el método descrito por Hopwood y col.(1985a).

III.10.5.- Preparación de DNA de colifagos. Cadena doble y cadena sencilla

Tanto para las preparaciones de cadena doble (a pequeña y gran escala) como para la purificación de cadena sencilla, se siguió el método descrito por Messing (1983) y Sambrook y col. (1989).

III.11.- Preparación de RNA de Streptomyces.

Básicamente se siguió el método descrito por Hopwood y col. (1985a) con algunas modificaciones.

Se partía de 125 ml de medio líquido SY crecido hasta que el antibiótico daba una coloración muy intensa al medio (4-5 días en condiciones standard o 24-30 horas si las esporas eran pregerminadas). En ese momento, se recogía el micelio pasando el cultivo a través del hielo contenido en un embudo que desembocaba en un filtro Whatman nº1 donde era retenido.

Las medidas de concentraciones de ácidos nucleicos se realizaron según Maniatis y col., 1982.

III.12.- Transformación génica

III.12.1.- Streptomyces

Para la transformación en Streptomyces, se siguió el método descrito por Hopwood y col. (1985a).

En caso de partir de protoplastos congelados, se descongelaban a 37°C, agitando suavemente.

La frecuencia de transformación obtenida era, aproximadamente, de 10^{8-9} transformantes por μg de DNA

III.12.2.- E.coli

Se siguió bien el método de Brown y col. (1979) o bien el descrito por Chung y Miller (1988) en función del método de preparación de las células competentes.

La frecuencia de transformación obtenida era, generalmente, de 10^8 transformantes por μg de DNA.

III.13.- Transfección génica

III.13.1.- Streptomyces

Para la transfección de DNA de fagos en Streptomyces, se utilizaban siempre protoplastos preparados en el momento, y en ciertas ocasiones

en las que la necesidad de obtener una alta frecuencia era crucial, se utilizaban liposomas de carga positiva preparados exactamente como describen Rodicio y Chater (1982). El proceso de transfección se realizó según Hopwood y col. (1985a).

La frecuencia de transfección fue, generalmente de 10^7 ufp/ μ g DNA y era mejorada en un orden de magnitud utilizando liposomas.

III.13.2.- E.coli

Para la transfección de DNA de fagos en E.coli, se siguió el método descrito por Messing (1983).

La frecuencia de transfección era similar a la de transformación, 10^8 ufp por μ g de DNA.

III.14.- Ensayos de actividad biológica

Los ensayos de actividad biológica del antibiótico actinorhodina se hacían bien sobre B.Subtilis, o bien sobre M.aureus.

En aquellos ensayos en los que se utilizaba M.aureus, se vertían sobre la placa con la cepa a chequear 8 ml de SNA a 45°C con 200 μ l de un cultivo de este microorganismo crecido durante la noche en medio LB. En los ensayos en que se utilizaba como microorganismo testigo B.subtilis se procedía como en el caso anterior con la diferencia de que sobre el SNA iban 20 μ l de una suspensión de esporas de Bacillus (por placa a ensayar) preincubadas 5'a 70°C para eliminar la fase vegetativa.

Los resultados eran visibles tras crecer las placas una noche a 37°C.

III.15.- Manipulación de Acidos Nucleicos

III.15.1.- Digestión enzimática del DNA

Las digestiones con endonucleasas de restricción se realizaban siguiendo los métodos descritos por Maniatis y col. (1982).

III.15.2.- Defosforilación de extremos 5' de DNA

La eliminación del fosfato del extremo 5' del DNA se realizaba añadiendo 1 unidad de fosfatasa alcalina de timo de ternera (Boehringer) directamente sobre la digestión que generaba dicho extremo e incubándolo 20-45' a 37°C. La alta actividad de esta enzima permitía su buen funcionamiento a pesar de no utilizar en ocasiones las condiciones salinas óptimas.

El hecho de no llevar ninguna traza de amonio, hacía que la enzima de esta casa comercial fuera adecuada para desfosforilar DNA's que iban a ser marcados posteriormente con polinucleótidoquinasa, enzima extremadamente sensible a sales de amonio.

III.15.3.- Relleno de extremos cohesivos de DNA

Para romar extremos cohesivos de DNA generados por digestión con endonucleasas de restricción se seguían los protocolos descritos por Maniatis y col. (1982) para el uso de DNA polimerasa fragmento Klenow en el caso de extremos 5' protuberantes, y de T4 DNA polimerasa en el caso de extremos 5' recesivos.

III.15.4.- Ligación de fragmentos de DNA

Para la ligación de fragmentos de DNA se seguía el método recomendado por Maniatis y col. (1982). En general se utilizaban vectores desfosforilados y un exceso molar de fragmento a clonar de 2-3 veces. En los casos en los que se requería forzar las condiciones, se añadía gelatina a 100 µg/ml (Burns y Beacham, 1983) o PEG 6000 15% final (Buckel, 1985).

III.15.5.- Digestión de DNA con Exonucleasa III

Se seguía el protocolo descrito por Henikoff (1984) utilizando 50 unidades de Exonucleasa III por microgramo de DNA e incubando durante 75".

Nunca se obtuvo una población de fragmentos sincronizada, sino que en cada digestión se generaban moléculas digeridas entre 0 y 2000 pares de bases.

III.15.6.- Digestión de DNA con Bal31

Se seguía el protocolo descrito por Maniatis y col. (1982).

Las digestiones realizadas con este enzima siempre resultaron asimétricas.

III.15.7.- Electroforesis en geles de agarosa

Las moléculas de DNA se separaban electroforéticamente en geles de agarosa a distintas concentraciones en función del tamaño de las moléculas a separar, utilizando TBE como tampón y bromuro de etidio 0.5 µg/ml final como colorante.

En aquellas ocasiones en las que se querían identificar híbridos DNA-RNA, se utilizaban geles de agarosa alcalinos según describe Maniatis y col. (1982)

III.15.8.- Electroforesis en geles de acrilamida

Se realizaban según describe Maniatis y col. (1982).

Las concentraciones utilizadas eran del 6% para los geles de secuenciación, del 12% para la visualización de oligonucleótidos y del 4% al 8% para separar bandas de 60-160 pares de bases.

III.15.9.- Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Se realizaba bien utilizando membrana de diálisis -Maniatis y col.(1982)- o bien mediante trampa salina.

Cuando utilizábamos agarosa de bajo punto de fusión el protocolo seguido era el descrito por Hopwood y col. (1985a).

III.15.10.- Preparación de sondas radiactivas de DNA

Se utilizaban básicamente dos métodos : bien marcando un extremo del DNA sonda (siguiente apartado) o bien marcando homogéneamente el DNA.

Para el marcaje homogéneo de fragmentos de DNA a utilizar como sonda radiactiva se seguían dos sistemas indistintamente, por Nick translation -Maniatis y col.(1982)- o por hibridación al azar con oligonucleótidos y extensión con DNAPolimerasa fragmento Klenow. Siempre se utilizaban 25 μ Ci de α^{32} P-dCTP para marcar.

Una vez realizado el marcaje se separaban los nucleótidos incorporados de los no incorporados mediante una cromatografía de filtración en gel a través de sefadex G-50 equilibrada con TE.

III.15.11.- Obtención de extremos 5' y 3' de DNA marcados radiactivamente

Los extremos 5' del DNA se marcaban con γ^{32} P-ATP y T4 polinucleótidokinasa tras desfosforilar y chequear esta desfosforilación mediante ligación. El protocolo seguido para el marcaje era el descrito por Maniatis y col.(1982). Realizado el marcaje, se purificaba la banda de DNA deseada mediante filtración por una columna de sephadex G-50 -Maniatis y col.(1982)- en el caso de banda única o mediante electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión en el caso de varias bandas. Siempre se utilizaban 50 pmoles de DNA y 150 μ Ci de ATP para la reacción.

Para marcar extremos 3' recesivos de DNA, se utilizaba DNA polimerasa fragmento Klenow (Maniatis y col.(1982)) y el α -dNTP 32 P adecuado para rellenarlo (pEj. dGTP para BamHI).

III.15.12.- Transferencia de DNA a filtros de nitrocelulosa e hibridación de Acidos nucleicos.

Se seguía el protocolo descrito por Maniatis y col.(1982) utilizando 20xSSC como tampón de transferencia, transfiriendo 3-8 horas e hibridando 6-12 horas sobre tampón 5xDenhart/4xSSC/200 μ g/mlDNA timo de ternera o de esperma de salmón desnaturalizado y utilizando aproximadamente 10^6 cpm/ml.

III.15.13.- Mapeo de S1 de alta resolución

Las identificaciones de inicio y parada de transcripción se realizaban según el método de Murray (1986).

III.15.14.- Secuenciación del DNA

Para secuenciar el DNA se utilizaban el método de terminación de la cadena (Sanger y col., 1977), con el uso de la adaptación de Cheng y Seeburg (1985) para DNA's de doble cadena cuando se utilizaba ésta, y el método de modificación química (Maxam y Gilbert, 1980) para la identificación precisa de inicios y páradadas de transcripción.

El hecho de que el DNA de Streptomyces posea un contenido en G-C tan elevado provocaba que a la hora de secuenciar se generen estructuras secundarias muy estables que se traducirán en fuertes compresiones en los geles de secuencia impidiendo su lectura. Para solucionar esto, se utilizaba sistemáticamente el nucleótido 7-Deaza-2'-Deoxiguanosina 5'-trifosfato como sustituto del dGTP. Este nucleótido no forma enlaces con los dCTP y por tanto reduce espectacularmente las compresiones. En algunas ocasiones, se utilizó también el análogo dITP.

Se utilizaban indistintamente las enzimas sequenase (de la USB) y DNA polimerasa fragmento Klenow. En el primer caso, la casa comercial suministra todo lo necesario, en el segundo las mezclas de reacción utilizadas fueron las siguientes :

	MEZCLA			
	A	C	G	T
dCTP	107 μ M	20 μ M	150 μ M	120 μ M
7d-dGTP	107 μ M	143 μ M	10 μ M	120 μ M
dITP	107 μ M	143 μ M	151 μ M	6 μ M
ddATP	11 μ M	-	-	-
ddCTP	-	50 μ M	-	-
ddGTP	-	-	66 μ M	-
ddITP	-	-	-	240 μ M

Las diluciones se hacían en TE.

III.15.15.- Mutagénesis dirigida de DNA

El protocolo seguido era el descrito por la casa comercial Amersham como "Oligonucleotide-directed mutagenesis system version 2".

La eficiencia de este método fue del 85%.

III.16.- Soporte informático.

Brujene : Para el análisis de secuencias de Streptomyces (búsqueda de ORF's, uso de codones ..etc.) (Jesus Vara, comunicación personal. Similar al "codon preference" de los programas para biología molecular de la universidad de Wisconsin, pero adaptado a Streptomyces).

Strider : Para el trabajo rutinario con secuencias de DNA (búsqueda de dianas de enzimas de restricción..) (Marck, 1988)

McDrawII : Para la realización de dibujos y figuras.

McWord 3.01V : Para los textos.

GCG Wisconsin : Para análisis de secuencias de DNA y proteínas, comparaciones, etc. (Programas de The University of Wisconsin Genetics computer group, U.W. Biotechnology center, Madison, USA).

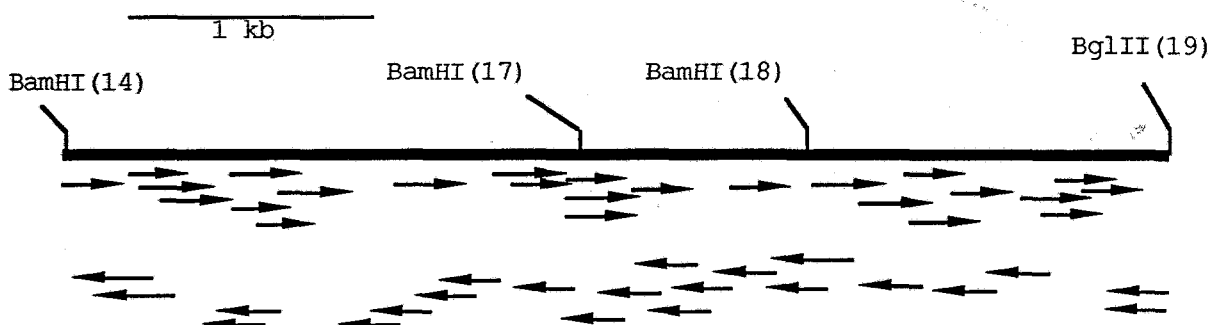
IV. - RESULTADOS

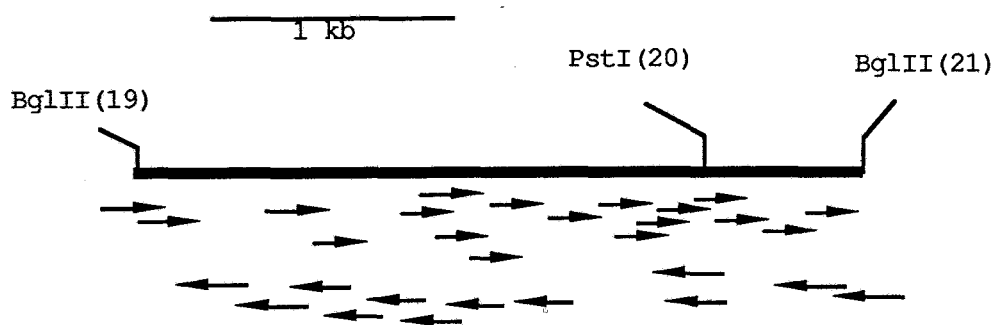
IV.1.- SECUENCIACION DE LA REGION IMPLICADA EN LAS PRIMERAS ETAPAS DE BIOSINTESIS DE ACTINORHODINA.

Datos previos a este trabajo, habían determinado que la información génica completa para la biosíntesis de actinorhodina estaba situada en un fragmento de 33 kb del cromosoma de *S.coelicolor* (Malpartida y Hopwood, 1984). Posteriormente, datos genéticos y bioquímicos localizaron las regiones codificantes de este fragmento físicamente agrupadas en 25 kb (fig.7, pag.15) (Malpartida y Hopwood, 1986). Datos de S1 (Malpartida, comunicación personal) unidos a datos genéticos anteriores (Rudd y Hopwood, 1979) revelaron la presencia de varios mensajeros policistrónicos que parecían codificar genes involucrados en distintos momentos de la ruta de biosíntesis. Así, el mRNA policistrónico localizado en la región derecha del "cluster" (fig.7, pag.15) codifica la información génica responsable de las primeras etapas de la ruta, mientras que el policistrón situado a la izquierda codifica genes implicados en reacciones posteriores.

En un intento de identificar y caracterizar las primeras etapas enzimáticas de la ruta de biosíntesis de actinorhodina, procedimos a la secuenciación de esta región, tomando como punto de partida el sitio BamHI (coord.14, fig.7, pag.15) que se sugería anterior al inicio del mRNA policistrónico que cruza esta zona del "cluster" *act*. La estrategia de secuenciación y la propia secuencia de nucleótidos se resumen en las figuras 8 y 9 (pags.32-33, 35-44) respectivamente.

El análisis de la secuencia, basado en el tipo de bases presentes en segunda y tercera posición de los posibles codones (fig.10, pag.45), sugirió la existencia, en esta región del "cluster" *act*, de 9 ORF's completas y el final de una décima en la parte distal de la secuencia. Las posibles fases de lectura se denominaron : actIORF1, 2, 3, actORF4, 5, 6, 7, 8 y 9 y ORF10. Así mismo, este análisis sugiere que las distintas ORF's podrían estar codificadas por, al menos, 3 mensajeros. El primer mRNA se transcribiría de izquierda a derecha y sería policistrónico para las ORF's 1,2,3,4,5 y 6. El segundo mensajero, se transcribiría en dirección opuesta al anterior y sería probablemente policistrónico, codificando la información de las ORF's 7 y 8. El mensajero que codifica la actORF9, sería a su vez divergente al de las ORF's 7 y 8 y probablemente constituya el más distal del "cluster" *act*. Por último, de la ORF incompleta, ORF10, tan solo podemos decir que su transcripción sería divergente con respecto a la del mensajero de la actORF9, que le precede, y que estaría separado de éste por una serie de, al menos, 5 grupos de secuencias directamente repetidas y probablemente no codificantes (fig.9, pag.44).





En aquellos puntos en los que sólo se leyó una cadena del DNA, se hizo con al menos dos clones, varias veces y tanto con "sequenase" como con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa.

Fig. 8.- Estrategia de secuenciación de la región derecha del "cluster" act.

Un análisis más detallado de la secuencia de nucleótidos (fig.9, pags.35-44), nos reveló los siguientes datos :

El probable inicio de traducción de la actIORF1 (1274 pb/ 424 aa) parece ser un codón TTG (Leucina, nucleótido 107), inusual pero que aparece en cierta proporción en algunos microorganismos, <1% en E.coli (Gold y Stormo, 1987), y que, aunque bastante inesperado en un genoma con un contenido tan elevado en G-C como el de Streptomyces, no es la única evidencia (Leskiw y col.,1989) dentro de los 63 genes de este género observados (ver tabla 3, pag.8). Este presunto codón de iniciación de la actIORF1, va precedido (nucleótidos 91-97) por una secuencia de unión al ribosoma de acuerdo, tanto en secuencia como en distancia al inicio de traducción, con las descritas para otros genes de Streptomyces (Hopwood y col., 1986a). Finalmente, el extremo 3' de la actIORF1 termina con el codón TGA, utilizado por el 81% de los genes de Streptomyces (ver tabla 3, pag.8), y solapa cuatro nucleótidos con el inicio de traducción de la actIORF2 (nucleótido 1378) en una disposición (...ATGA...) relativamente usual en algunos genes de este género que presentan un probable acoplamiento transcripcional y traduccional (Sherman y col.,1989; Bibb y col.,1989).

El inicio de traducción de la actIORF2 (1223 pb/ 406 aa) no va precedido de una secuencia consenso de unión al ribosoma de acuerdo con las descritas (Hopwood y col.,1986a), aunque mantiene una región de polipurinas a 7 pb que podría funcionar como tal (nucleótidos 1366-1370). El codón de terminación de la actIORF2 es TAA (nucleótido 2599), el más raro de los utilizados para esta función por Streptomyces, 3% de los 63 genes observados, (ver tabla 3, pag.8).

Entre el final de la actIORF2 y el inicio de la actIORF3 existe una secuencia de 24 nucleótidos (2602-2625) aparentemente no codificante.

La actIORF3 (261 pb) codifica la proteína más pequeña de las denominadas de expresión temprana en el "cluster" act (86 aa). Comienza con un ATG (nucleótido 2626) precedido de un típico sitio de unión del ribosoma (nucleótidos 2616-2621) y termina en un TGA (nucleótido 2884) que solapa con el inicio de la actORF4 en una disposición similar a la presente en las actIORF's 1 y 2, (..ATGA..).

La actORF4 (950 pb/ 309 aa) es precedida por un sitio de unión al ribosoma de acuerdo con los consenso (nucleótidos 2875-2878) (Hopwood y col., 1986a). Comienza probablemente con ATG (nucleótido 2883) y su extremo 3' termina en TGA (nucleótido 3831) solapando con el inicio de la actORF5 del mismo modo que actIORF's 1 y 2, actIORF's 3 y actORF4 (..ATGA..).

La actORF5 (893 pb/ 206 aa) comienza con un ATG (nucleótido 3830), que no va precedido de una región rica en purinas y por tanto sin un sitio de unión al ribosoma típico, y termina con TAG (nucleótido 4721), codón utilizado como señal de parada de traducción en el 16% de los 63 genes observados (ver tabla 3, pag.8).

El estudio de la secuencia en la región de la actORF6 no nos permite asegurar con precisión cuál de los cinco codones de iniciación situados entre los nucleótidos 4735 y 4790 y sobre la única fase de lectura posible (fig.10, pag.45), es realmente el inicio de traducción del gen. La comparación con otros genes a nivel de sitio de unión del ribosoma y distancia de éste al inicio de traducción nos lleva a pensar como más probable en el ATG posición 4736, con el RBS entre los nucleótidos 4722 y 4727. El extremo 3' de esta ORF es un codón de terminación TGA (nucleótido 5266).

Como hemos comentado anteriormente, las siguientes ORF's ,actORF7 y 8, se hallan probablemente sobre el mismo mensajero, que sería transcrito en sentido contrario a las ORF's anteriores (fig.10, pag.45). ActORF7 (498 pb/ 165 aa) comenzaría en un ATG (nucleótido 5784) precedido por un sitio de unión del ribosoma similar al de otros genes descritos (Hopwood y col., 1986a) (nucleótidos 5794-5798) y termina en un TGA (nucleótido 5289) (fig.9, pag.41). La ActORF8, separada 50 pb de la actORF7, comenzaría con GTG (nucleótido 6641), triplete utilizado hasta un 30% para inicio de traducción en Streptomyces. Aparentemente, no posee una secuencia que pueda ser un potencial sitio de unión al ribosoma considerada como consenso en Streptomyces. El codón de terminación de la traducción de la actORF8 sería un TGA (nucleótido 5840) (fig.9, pag.42).

La actORF9, se transcribiría en sentido divergente a las actORF7 y 8. Su presunto codón de iniciación no está muy claro entre los varios posibles (nucleótidos 6575, 6581, 6599, 6620 y 6632) y ninguno de ellos posee un sitio de unión al ribosoma similar a otros descritos en este género. Es de desatacar la posibilidad de un solapamiento entre los genes codificados por la actORF8 y 9. El codón de parada de esta ORF sería un TGA (nucleótido 7169) (fig.9, pag.43).

Fig. 9.- Secuencia de nucleótidos de la región temprana y media del "cluster" act. (coords.14-21, fig.7, pag.15).

BamHI (14) .

1 GGATCCGGCATCGAGGGTCCCGTATCGGCCTTCGAGCCTCCTTCGAGCCACGGGGCCGA 60

61 CGATGACGACGACCACCGGACGAACGCATCGAAGGAGCTGTTTCGGATTGAAGCGCAGAGT 120
 actIORF1 >> rbs? L K R R V

121 CGTCATCACGGGCGTCGGCGTCCGCGCCCCCGGCGGGAACGGCACCCGGCAGTTCTGGGA 180
 V I T G V G V R A P G G N G T R Q F W E

181 ACTGCTCACCTCGGGGCGGACGGCGACGCGCCGGATCTCGTTCTTCGACCCCTCGCCCTA 240
 L L T S G R T A T R R I S F F D P S P Y

241 CCGTTCACAGGTTCGCGGCGGAGGCCGACTTCGACCCGGTCGCGGAGGGCTTCGGCCCCGCG 300
 R S Q V A A E A D F D P V A E G F G P R

301 GGAGCTCGACCGGATGGACCGGGCCTCGCAGTTCGCCGTGGCCTGTGCCCGGGAGGCGTT 360
 E L D R M D R A S Q F A V A C A R E A F

361 CGCCGCCAGCGGGCTCGACCCGGACACCCTCGACCCCGCCCGGGTCGGGGTCAGCCTCGG 420
 A A S G L D P D T L D P A R V G V S L G

421 CAGCGCGGTGGCAGCGGCGACAGCCTGGAGCGCGAGTATCTGCTGCTGTTCGGACTCCGG 480
 S A V A A A T S L E R E Y L L L S D S G

481 CCGTGACTGGGAGGTTCGACGCGGCCTGGCTGTCCCGGCACATGTTTCGACTACCTGGTGCC 540
 R D W E V D A A W L S R H M F D Y L V P

541 CAGCGTCATGCCGGCCGAGGTTCGCTGGGCGGTTCGGCGCCGAGGGCCCGGTACGATGGT 600
 S V M P A E V A W A V G A E G P V T M V

601 CTCCACCGGCTGCACCTCGGGCCTGGACTCCGTTCGGCAACGCGGTCCGGGCGATCGAGGA 660
 S T G C T S G L D S V G N A V R A I E E

661 GGGCAGCGCCGACGTGATGTTTCGCGGGAGCCGCCGACACCCCGATCACCCCGATCGTTCGT 720
 G S A D V M F A G A A D T P I T P I V V

721 CGCCTGCTTCGACGCGATCCGCGCCACGACGGCGCGCAACGACGACCCGGAACACGCCTC 780
 A C F D A I R A T T A R N D D P E H A S

781 GCGGCCGTTTCGACGGTACGCGGGACGGCTTCGTGCTGGCCGAAGGAGCCGCGATGTTTCGT 840
 R P F D G T R D G F V L A E G A A M F V

841 CCTGGAGGACTACGACAGCGCGCTGGCCCCGCGGAGCCCGCATCCACGCCGAGATCTCGGG 900
 L E D Y D S A L A R G A R I H A E I S G

901 GTACGCGACGCGCTGCAACGCGTACCACATGACGGGCCTGAAGGCCGACGGCCGCGAGAT 960
 Y A T R C N A Y H M T G L K A D G R E M

961 GGCCGAGACCATCCGGGTCGCCCTCGACGAGTCCCGCACGGACGCGACGGACATCGACTA 1020
 A E T I R V A L D E S R T D A T D I D Y

1021 CATCAACGCGCACGGCTCCGGCACC CGG CAGAACGACCGCCACGAGACAGCGGCGTACAA 1080
 I N A H G S G T R Q N D R H E T A A Y K

1081 GCGCGCCCTCGGCGAACACGCGCGGCGCACTCCGGTCAGCTCGATCAAGTCGATGGTTCGG 1140
 R A L G E H A R R T P V S S I K S M V G

1141 CCACTCGCTGGGCGCGATCGGCTCGCTGGAGATCGCGGCCGTCGTACTCGCCCTCGAACA 1200
 H S L G A I G S L E I A A V V L A L E H

1201 CGGCGTGGTGCCCCGACCGCCAACCTGCGCACCAGCGACCCCGAGTGCGATCTCGACTA 1260
 G V V P P T A N L R T S D P E C D L D Y

1261 CGTTCCGCTGGAGGCCAGGGAGCGGAAGCTGCGGTCCGTACTCACCGTGGGCAGCGGCTT 1320
 V P L E A R E R K L R S V L T V G S G F

1321 CGGCGGCTTCCAGAGCGCGATGGTGTGCGCGACGCCGAGACCGCGGGGGCGGCCGCATG 1380
 G G F Q S A M V L R D A E T A G A A A *
 actIORF2 >> rbs? M

1381 AGCGTCCTCATCACCGAGTCGGCGTCGTGCGACCCAACGGCCTCGGCCTGGCGCCGTAC 1440
 S V L I T G V G V V A P N G L G L A P Y

1441 TGGTCGGCGGTGCTGGACGGCCGCCACGGCCTCGGCCCGGTCACCCGCTTCGACGTGAGC 1500
 W S A V L D G R H G L G P V T R F D V S

1501 CGGTACCCGGCGACCCTCGCCGGCCAGATCGACGACTTCCACGCGCCGGACCACATCCCG 1560
 R Y P A T L A G Q I D D F H A P D H I P

1561 GGCCGGTTGCTGCCGAGACGGACCCCTCCAC7CGGCTCGCGCTGACCGCCGCGGACTGG 1620
 G R L L P Q T D P S T R L A L T A A D W

1621 GCCCTCCAGGACGCGAAGGCGGACCCGGAGTCGCTGACCGACTACGACATGGGCGTGGTG 1680
 A L Q D A K A D P E S L T D Y D M G V V

1681 ACCGCCAACGCCTGCGGTGGGTTCTGACTTCACCCACCGGGAGTTCGCAAGCTGTGGTCC 1740
 T A N A C G G F D F T H R E F R K L W S

1741 GAGGGCCCCAAGTCGGTCAGCGTGTACGAGTCCTTCGCCTGGTCTACGCGGTGAACACC 1800
 E G P K S V S V Y E S F A W F Y A V N T

1801 GGCCAGATCTCCATCCGGCAGGTATGCGCGGTCCGAGCAGTGCCCTGGTCGCCGAGCAG 1860
 G Q I S I R H G M R G P S S A L V A E Q

1861 GCCGGGGGCTGGACGCCCTGGGCCACGCCCGCCGTACGATCCGCCGCGGCACGCCGCTG 1920
 A G G L D A L G H A R R T I R R G T P L

1921 GTGGTCTCCGGCGGGGTGGACTCGGCACTCGACCCGTGGGGCTGGGTCTCGCAGATCGCC 1980
 V V S G G V D S A L D P W G W V S Q I A

1981 AGTGGCCGGATCAGCACGGCCACCGATCCGGACCGGGCGTATCTGCCCTTCGACGAGCGG 2040
 S G R I S T A T D P D R A Y L P F D E R

2041 GCGGCCGGCTACGTTCCGGGCGAGGGCGGGGCCATCCTCGTCCTGGAGGACAGCGCCGCG 2100
 A A G Y V P G E G G A I L V L E D S A A

2101 GCCGAGGCCCGCGGCCGGCAGACGCGTACGGCGAACTCGCCGGCTGCGCCTCCACCTTC 2160
 A E A R G R H D A Y G E L A G C A S T F

. BamHI (17)
 2161 GACCCCGCCCCCGGATCCGGACGGCCCGGGCCTGGAACGCGGATCCGGCTGGCGCTG 2220
 D P A P G S G R P A G L E R A I R L A L

2221 AACGACGCCGGGACCGGTCCCGAGGACGTGACGTCTGTTCGCCGACGGCGCGGGCGTG 2280
 N D A G T G P E D V D V V F A D G A G V

2281 CCCGAGCTGGACGCCGCCGAGGCCCGGGCGATCGGCCGGGTGTTCCGGCCGGAAGGGGTG 2340
 P E L D A A E A R A I G R V F G R E G V

2341 CCCGTCACCGTCCCCAAGACGACGACGGGCCGCTCTACTCCGGCGGGCGGCCGCTCGAC 2400
 P V T V P K T T T G R L Y S G G G P L D

2401 GTGGTCACCGCCCTGATGTCCCTGCGCGAAGGGGTGATCGCGCCGACCGCGGGCGTGACG 2460
 V V T A L M S L R E G V I A P T A G V T
 2461 TCCGTACCCCGGGAGTACGGCATCGACCTGGTGCTCGGCGAACCCCGCAGCACGGCCCCG 2520
 S V P R E Y G I D L V L G E P R S T A P
 2521 CGCACCGCACTGGTCCTGGCCAGGGGCGCTGGGGCTTCAACTCGGCGGCGGTCTCTGCGC 2580
 R T A L V L A R G R W G F N S A A V L R
 2581 CGTTTCGCACCGACCCCGTAACGACCCCGAGAAGCTGGAGAAAGCCATGGCAACCCTGCTG 2640
 R F A P T P * **actIORF3 >> rbs?** M A T L L
 2641 ACCACCGACGATCTGCGCCGCGCCCTCGTGGAGTGCGCCGGTGAGACGGACGGGACGGAC 2700
 T T D D L R R A L V E C A G E T D G T D
 2701 CTGTCCGGCGACTTCCTCGACCTCCGCTTCGAGGACATCGGGTACGACTCGCTCGCCCTG 2760
 L S G D F L D L R F E D I G Y D S L A L
 2761 ATGGAGACCGCGGCGCGACTCGAGAGCCGGTACGGCGGTGTCCATACCCGACGACGTGCGC 2820
 M E T A A R L E S R Y G V S I P D D V A
 2821 GGCCGCGTCGACACGCCGCGAGAGCTGCTCGACCTGATCAACGGCGCACTGGCCGAGGCG 2880
 G R V D T P R E L L D L I N G A L A E A
actORF4 >> rbs?
 2881 GCATGAGCCGGCCGGGAGAACACCGGGTGGTCCACACCTGAGGACCCAGGCCCCGGCGC 2940
 A *
 M S R P G E H R V V H T L R T Q A P A R
 2941 GGGGGCTCTACGAGCTGGTCGCACGCGTCAAGACTGGCCGGCCGTCTTCAACCCACCG 3000
 R L Y E L V A R V E D W P A V F E P T V
 3001 TGCACGTACAGGTCTTGAGCGCGGCGCCGACCGAACGCTTCCGGATCTGGGCGCGCG 3060
 H V Q V L E R G P G T E R F R I W A R V
 3061 TGGGCGGCCGGGTGAAGACCTGGACGTCCCGCGGACGCTGGATCCCGACACCTGAGGG 3120
 G G R V K T W T S R R T L D P D T L R V
 3121 TGACGTTCCGCCAGGAGCTCACCAGCCGCCCATCGCCTCGATGGGCGGGAGCTGGGAGT 3180
 T F R Q E L T Q P P I A S M G G S W E F

BamHI(18)

3181 TCCGGGGCGACGGCGACGGCACCGAAGTCGTGCTGACCCACGACTTCGCCCGGGTCGACG 3240
 R G D G D G T E V V L T H D F A A V D E

3241 AAGCCGCCCTGCCGGGACTGCGCGAGGCGCTGGACGCGAACAGCGGGAAGGAGCTGGCCG 3300
 A A L P G L R E A L D A N S G K E L A A

3301 CGCTGGTCGCGCTGGCGGAGCGCCGGCAGCCGCCGAGGAGCTGGTCTTCACGTTTCGAGG 3360
 L V A L A E R R Q P P E E L V F T F E D

3361 ACACGCTCCGGGTGCCGTCCGGGGACGACGCCTACGCCTTCATCGAGCGCAGCGACCTGT 3420
 T L R V P S G D D A Y A F I E R S D L W

3421 GGCAGGAACGGCTGCCGCACGTGCCGAAGGTGACACTCACCGAGGAGGCGGCGGGTACCG 3480
 Q E R L P H V R K V T L T E E A A G T G

3481 GCCCCGCCGAGACGCGGGACATGACCGTCCAGGACATGACCATGGAGACGGTGACCACCG 3540
 P A E T R D M T V Q D M T M E T V T T D

3541 ACGGCGGTACCCACACCACCCGTCGATCCGGCTCTGCGTCCCCGCGAGGAGCATCGTGT 3600
 G G T H T T R S I R L C V P A R S I V Y

3601 ACAAGCAGCTCGTCCCGCCCGCCCTGCTCTCCGGGCACTGCGGCGCCTGGACCTTCGGCG 3660
 K Q L V P P A L L S G H C G A W T F G E

3661 AGGACACGGTCACCGCCCGCCACACCGTGGCGATCGACCCGGCCCGCGTGGAAGAGGTCC 3720
 D T V T A R H T V A I D P A R V E E V L

3721 TGGGCAAAGGCGCGACCGTCGCGGACGCCCGTACCCATCTGCGCGAGGTGCTCGGTGCCA 3780
 G K G A T V A D A R T H L R E V L G A N

3781 ACAGCCGGGCCACGCTCCGCCACGCGGCGCGCCGCCGGGCGGCGTCATGACGGTCTGA 3840
 S R A T L R H A A A A A G P A S *
 actORF5 >> M T V E

3841 GGTCCGTGAGGTGCGCGAGGGTGTCTACGCCTACGAGCAGGCCCCCGGCGGCTGGTGCGT 3900
 V R E V A E G V Y A Y E Q A P G G W C V

3901 CAGCAACGCGGGCATCGTGGTGGGCGGCGACGGCGCGCTCGTCGTCGACACGCTGTGAC 3960
 S N A G I V V G G D G A L V V D T L S T

3961 GATCCCGAGGGCGCGGCGGCTGGCGGAGTGGGTCGACAAGCTCGCCGCGGGCCCCGGCCG 4020
 I P R A R R L A E W V D K L A A G P G R

4021 TACCGTGGTCAACACCCACTTCCACGGCGACCACGCCTTCGGCAACCAGGTCTTCGCGCC 4080
 T V V N T H F H G D H A F G N Q V F A P

4081 GGGGACGCGGATCATCGCGCACGAGGACATGCGGTCCGCCATGGTGACGACCGGCCTGGC 4140
 G T R I I A H E D M R S A M V T T G L A

4141 CCTCACCGGGCTCTGGCCGCGGGTCGACTGGGGCGAGATCGAGCTGAGGCCGCCGAACGT 4200
 L T G L W P R V D W G E I E L R P P N V

4201 GACCTTCCGCGACCGGTTGACCCTGCACGTGCGCGAGCGACAGGTGGAAGTATCTGCGT 4260
 T F R D R L T L H V G E R Q V E L I C V

4261 CGGCCCCGCGCACACCGATCACGACGTGGTGGTCTGGCTGCCCCGAGGAGCGGGTGCTGTT 4320
 G P A H T D H D V V V W L P E E R V L F

4321 CGCGGGGGACGTGTCATGTGCGGGCGTCACTCCGTTGCCCCCTCTTCGGTTCGGTGGCCGG 4380
 A G D V V M S G V T P F A L F G S V A G

4381 CACGCTGGCCGCGCTCGACCGGCTGGCGGAGCTGGAGCCCCGAGGTGGTTCGTCGGCGGGCA 4440
 T L A A L D R L A E L E P E V V V G G H

4441 CGGCCCCGTGGCGGGACCCGAGGTGATCGACGCCAACCAGGACTATCTGCGCTGGGTCCA 4500
 G P V A G P E V I D A N R D Y L R W V Q

4501 GCGCCTCGCCGCCGATGCGGTGCGCCGCGGCTGACACCGTTGCAGGCCGCGCGCCGGGC 4560
 R L A A D A V D R R L T P L Q A A R R A

4561 GGACCTCGGCGCCTTCGCCGGGCTGCTGGACGCGGAGCGCCTCGTCGGAACCTGCACCG 4620
 D L G A F A G L L D A E R L V A N L H R

4621 GGCCACGAGGAGCTGCTGGGCGGGCACGTGCGTGACGCCATGGAGATCTTCGCGGAGCT 4680
 A H E E L L G G H V R D A M E I F A E L

4681 GGTGCGCTACAACGGTGGGCAGCTGCCCACCTGCCTCGCCTAGGGAGTTCGAAGATGGCA 4740
 V A Y N G G Q L P T C L A *
 actORF6 >> rbs? M A

4741 GCCGACCAGGAATGCTCCGGGACGCCATGGCCCGGTGCCGCCGGGTGGCGCTCGTC 4800
 A D Q G M L R D A M A R V P A G V A L V

4801 ACCGCCCATGACCGCGGGGGAGTCCCGCACGGTTTCACCGCCAGTTCGTTCTGTCGCTC 4860
 T A H D R G G V P H G F T A S S F V S V

4861 TCGATGGAGCCGCCACTGGCACTGGTCTGCCTGGCTCGTACGGCCAACTCCTTCCCGGTG 4920
 S M E P P L A L V C L A R T A N S F P V
 4921 TTCGACAGTTGCGGCGAGTTCGCGGTGAGCGTGCTGCGCGAGGACCACACGGACCTGGCC 4980
 F D S C G E F A V S V L R E D H T D L A
 4981 ATGCGCTTCGCGCGCAAGTCCGCGGACAAGTTCGCGGGCGGGGAGTTCGTCCGTACCGCG 5040
 M R F A R K S A D K F A G G E F V R T A
 5041 CGGGGAGCGACCGTGCTCGACGAGCGGTGCGGTCGTGAGTGCACGGTCCACGAGCGC 5100
 R G A T V L D G A V A V V E C T V H E R
 5101 TACCCGGCGGGCGACCACATCATCCTGCTCGGCGAGGTCCAGTCCGTGCACGTGAGGAG 5160
 Y P A G D H I I L L G E V Q S V H V E E
 5161 AAGGGCGTACCGGCGGTCTACGTGGACCGCCGGTTCGCCGCCCTGTGCTCGGGCGGCGGT 5220
 K G V P A V Y V D R R F A A L C S A A G
 5221 GCCTGCCCCGTCCGCCACCGGGCGGGGCGTGCCCGCGCATGCCGGCTGAGGCCGGCCGGGA 5280
 A C P S A T G R G V P A H A G *
 5281 AGGCCGTCAGCGGCCCGTGGCACCGTCGATCAGCTCGCGGAGGATGTGCGGCGTGGCCGGC 5340
 AGTCGCCGGGCACCGTGGCAGCTAGTCGAGCGCCTCCTACAGCCGCACCGGCCG
 * R G T A G D I L E R L I D A H G A
 5341 GTGGCGGCCCGGTCTCCTCCACCATGTGGGTGAGGGCCAGCGGACACTGGGCGCGGGGCG 5400
 CACCGCCGGCCAGAGGAGTGGTACACCCACTCCCGGGTCGCCTGTGACCCGCGCCCCGC
 H R G T E E V M H T L A W R V S P A P R
 5401 GCCCGGTGCGGGCGGGGGAGCGGTGCGCCGAGGTGCGGTGCAGGCGTCGAGCACGCGGTT 5460
 CGGGCCAGCGCCGGCCCCCTCGCCACGCGGCTCCAGCCACGTCCGCGAGCTCGTGCGCAA
 G P R P R P L P A G L D T C A D L V R N
 5461 CGCCCGTTCGACGGCCTCCCGGTAGCGGGCGACGACGTGCGGCGACCGCTCCTGGGACGC 5520
 GCGGGCAAGCTGCCGGAGGGCCATCGCCCGCTGCTGCAGCCGCTGCGGCAGGACCCTGCG
 A R E V A E R Y R A V V D A V G D Q S A
 5521 GGCCCGGAACGTGCGCGGCCAGCTTCGCACCTCCTCCCCGAGGAAGACCGCGCGCTCGAC 5580
 CCGGGCCTTGACGCGGCCGTGGAAGCGTGAGGAGGGGCTCCTTCTGGCGCGCGAGCTG
 A R F T A P W S R V E E G L F V A R E V

5581 GTGGGTGAGTGGTTGAGCAGCCCGAGCAGGTTGGTGCCGGACGCCACCGCCGCGTGGC 5640
CACCCAGTCCACCAACTCGTCGGGCTCGTCCAACCACGGCCTGCGGTGGCGGGCGGCACGC
H T L H N L L G L L N T G S A V A A T R

5641 GACCTGCGGTTTCGGGGGCGTCCTCGACCTTGCCGGCGATCGAGGTCCGCAGGTAGTCGAG 5700
CTGGACGCCAAGCCCCCGAGGAGCTGGAACGGCCGCTAGCTCCAGGCGTCCATCAGCTC
V Q P E P A D E V K G A I S T R L Y D L

5701 GAACCCGCGCAGGGTCTCGGCCTACCGCCGCGGTTTCGGGGCGGCGGGGTGTCCCGGGC 5760
CTTGGGCGCGTCCAGAGCCGAGTGGCGGGCGGCCAAGCCCCGCGCCCCACAGGGCCGC
F G R L T E A E G G G T R P P P T D R R

5761 GTGGGTGCGGGGGGTGGTGGGCATGGTGACCGGCCTCCGGAAGGTGTGGGGCGGGCGGGC 5820
CACCCACGCCCCCACCACCCGTACCAGAGGCCGAGGCCTTCCACA
H T R P T T P M rbs?
<< actORF7

5821 CGCGGGCGCGGGGCCCCGTCACTCCGCGCGGCGGACGAGCAGGACGTGGTTCGACGACCTCG 5880
AGTCAGGCGCGCCGCTGCTCGTCTGCAACAGCTGCTGGAGC
* D A R R V L L V H D V V E

5881 GCGGTGCGCCCCCGGGGCGGTCGCGGTCCGGCGTGGCGCCTCGGCCCGTTTCGACCCGC 5940
CGCCACGCGGGCGGGCCCCGCGCAGCGCCAGGCCGACCGCGGAGCCGGGCAAGCTGGGCG
A T R G G P G T A T R R P A E A R E V R

5941 CACGTGCGCGGGTCCAGGGCGAGGTCCGCGCGACCTCCTGCGGGGCGGGTGGCGCGCG 6000
GTGCAGCGGGCCAGGTCCCCTCCAGGCGGCGCTGGAGGACGCCCCGGGCCACCGCGCGC
W T A P D L A L D A A V E Q P A P H R A

6001 TCGGGGTCTGGTCCACGACCACGGCGCCGTCGAGCCGTGGTTCGACGACCAGCAGCCGC 6060
AGCCCCAGGACCAGGGTGTCTGGTGGCGCGGAGCTCGGCACCAGCTGCTGGTTCGTCGGCG
D P D Q D W S W P A T S G H D V V L L R

6061 CCGCCCCGGGCGCAGCGCGTGC GCGGCCCCGCGCAGGACCGACGCGCGGTCCAGGTCTGAAG 6120
GGCGGGCCCCGCTCGCGCACGCGCGGGGCGCGTCTGGCTGCGCGCCAGGTCCAGCTTC
G G P R L A H A A G R L V S A R D L D F

6121 GCGGTGTGGAGGTAGTGCGCGCTGACCAGGTCTGAACCGGCCCTCGGGGAAGGAGTCGCGC 6180
CCGCACACCTCCATCACGCGCGACTGGTCCAGCTTGGCCGGGAGCCCCCTTCCTCAGCGCG
P T H L Y H A S V L D F R G E P F S D R

6181 AGGTCGTGCCGCACGGCGTCCGACAGGTCCGCGAGGCCGTGGGTCCGTGCGTGCCCCGCG 6240
TCCAGCACGGCGTCCGCGAGCTGGTCCAGCGGCTCCGGCACCCAGGCACGCACGGGGCGC
L D H R V A D V L T G L G H T R A H G A

6241 AGCCGCTCGGCCGCGACCCCGGAGATGTCCACGGCCGTGACCCGCCAGCCCCGCGGGCA 6300
TCGGCGAGCCGGCGCTGGGGCCTCTACAGGTGCCGGCACTGGGCGGTTCGGGGCGGGCCGT
L R E A A V G S I D V A T V R W G R R A

6301 AGCCACAGCGCGTCGCCGCCGCTGCCGCACCCCAGGTCCAGGGCGTCGCCGGGCGGCAGG 6360
TCGGTGTGCGCGCAGCGGGCGGCACGGCGTGGGGTCCAGGTCCCGCAGCGGGCCCGCGTCC
L W L A D G G S G C G L D L A D G P P L

6361 CCGGTGACCGTCTCGACCAGGCGGACGTTTCGGGCGGGGCGCGTCGGGCGCCGGGCGGGCG 6420
GGCCACTGGCAGAGCTGGTCCGCCTGCAAGCCCCGCCCGCGCAGCCCGCGGGCCCGCCCGC
G T V T E V L R V N P R P A D P A P R A

6421 GCGTACACGCCGTCCAGAACGTGACCGCGTCGGTGGTGCTCATCGGAATCCTTCAGTC 6480
CGCATGTGCGGCAGGGTCTTGCACTGGCGCAGCCACCACGAGTAGCCTTGAGGAAGTCAG
A Y V G D W F T V A D T T S M P V G E T

6481 GTTTCGGCCGGCGGGCGGGCGACGAGTCGGGCAACGCGCCGCGAGCCGTCGATGCGACCAG 6540
CAAAGCCGGCCCGCCCGCTGCTCAGCCCGTTGCGCGGCGCTCGGCAGCTACGCTGGTC
T E A P P P R R T P C R A A L R R H S W

6541 TCTCGACACCCTCCGCCCCGAACCGGCACGAAACTTGCGGTTGTGGCAAGGTGGCCCGAT 6600
AGAGCTGTGGGAGGCGGGCTTGGCCGTGCTTTTGAACGCCAACACCGTTCCACCGGGCTA
actORF9? >> L R L W Q G G P M
D R C G G G S G A R F S A T T A L H G S

6601 GGACGCCGCAACGGACGACGTGCTCGACGCCGTGGGCCACGCCTGCGCACGCTGCGCCG 6660
CCTGCGGCGTTGCTGCTGCACGAGCTGCGGCACCCGGGTGCGGACGCGTGCACGCGGC
D A A T D D V L D A V G P R L R T L R R
P R R L P R R A R R R P G V
<< actORF8?

6661 CGAGCGCGGCATCACCTCGCCACCTCTCGGCGGCGACCGGGGTGTCGGAGAGCACCT 6720
E R G I T L A H L S A A T G V S E S T L

6721 GTCCCGGCTGGAGAGCGGGCAGCGCCGTGCGACCCTGGAGCTGCTGCTGCCGCTCGCCCG 6780
S R L E S G Q R R A T L E L L L P L A R

6781 GATCTACGACGTCCCCCTGGACGACCTCGTCGGCGCCCCGCGCACGGGCGACCCCCGCAT 6840
I Y D V P L D D L V G A P R T G D P R I

6841 CCACCTGAAGCCGGTCAGGCGCTTCGGGATGGTCTTCGTGCCGCTGTCCCGGCGGCCGGG 6900
H L K P V R R F G M V F V P L S R R P G

6901 CGGCACCCAGGCCTTCAAAATGATCATCCCGAGCCGTCCGGCGCCGCTCGAACCGACCCC 6960
G T Q A F K M I I P S R P A P L E P T P

6961 GCAGACCCACGAGGGGTCCGAGTGGCTGTACGTGCTCAGCGCCGTCTGCGGTTGCTGGT 7020
Q T H E G S E W L Y V L S G R L R L L V

7021 CGGCGAGCGCGACCTGACGCTGTGCGCCGGTGAGGCGGCCGAGTTCGACACGTCGCTGCC 7080
G E R D L T L S P G E A A E F D T S L P

7081 GCACTGGCTGGGCAGCGCCGACGGCGGCGCGGTGGAATCCTCGTCCTGTTCGGGCTGCA 7140
H W L G S A D G G A V E L L V L F G L Q
PstI(20)

7141 GGGCGTGCGGGCCCATGTGCACAGCGGCTGAGAGCTTCCTGCCCCACGGCGTCGCCGAGC 7200
 G V R A H V H S G *

7201 GGGTCGGCTGGGCGCGCGAGGCGGCCGAGGCGACCCGGACCGGTGGGCGGAGGGCCCCG 7260

7261 GCGACAGTCCTGAGGGGGCGTCGCGTCCGCGTGTGCCCCGCGAGCCCGCCCGGTCCGTCG 7320

7321 CCCGGCGTCACATCCGTGCGTCGCCCCGCGAGCCCGCCCGGTCCGTCATCCGGCGTCACGC 7380

7381 CCGGTCCGTGCCCCGGCGTCACGCCCGGTCCGTCATCCGGCGTCACGCCCGGTCCGTAC 7440
 AGTGCGGGGCCAGGCAGTG
 * A R D T V

7441 CCGGCGGCAGGCCTCCACGTACCCGCGCACCAAGTGCCCGCCCCCTCGTCCTCGCGGGCGCCG 7500
 GGCCGCGCGTCCGGAGGTGCATGGGCGCGTGGTCACGGGCGGGGAGCAGGAGCGCCGCGGC
 R R C A E V Y G R V L A R G E D E R R R

7501 GGCCAGGGCGTAGCGGCTGGGGGACAGGCCGCGGACCGGGCGGGTGACCACCCCGCCCAG 7560
 CCGGTCCCGCATCGCCGACCCCTGTCCGGCGCCTGGCCCCGCCCCTGGTGGGGCGGGTC
 A L A Y R S P S L G R V P R T V V G G L

7561 GGTGATCAGCGGGGCGTTGCCCGTGGCCACCAAGGCAGATGCCGAGCCCGGGCGACCAGGGC 7620
 CCACTAGTCGCCCCGCAACGGGCAACCGGTGGTCCGTCTACGGCTCGGGCCGCTGGTCCCG
 T I L P A N G T A V L C I G L G A V L A

7621 CTCGTACGTCTCCTCCGTGCCGGAGATCT 7649
 GAGCATGCAGAGGAGGCACGGCCTCTAGA
 E Y T E E T G S I << actORF10

BglII(21)

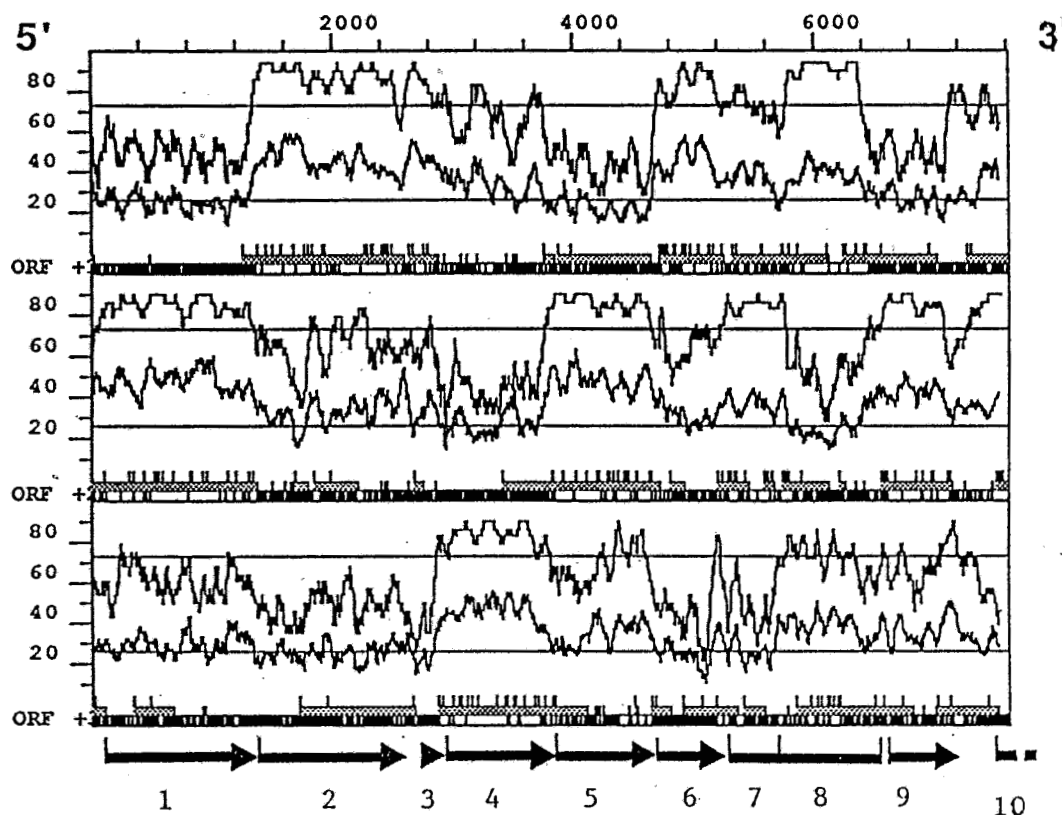
Los números que aparecen junto a los sitios de restricción hacen referencia a su coordenada en la figura 7 (pag.15).

>> significa probable dirección de transcripción. Deducida de la figura 10, pag.45

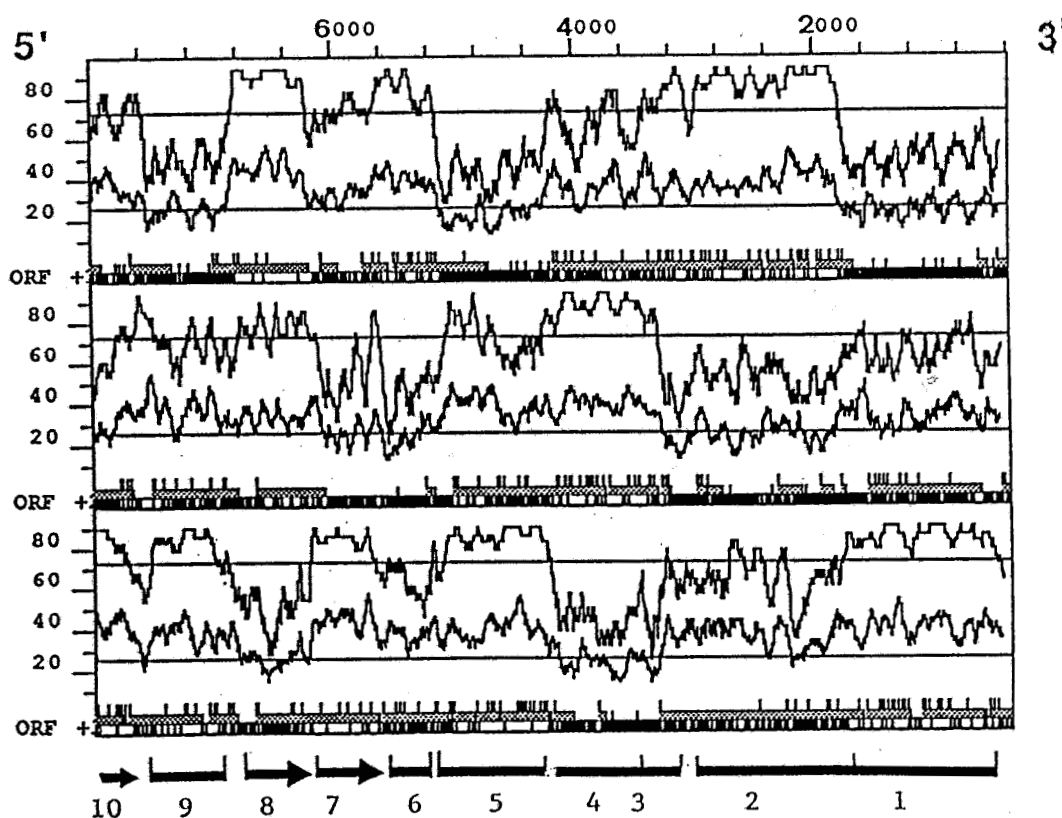
Las flechas hacen referencia a secuencias repetidas. Están numeradas para permitir su identificación en la figura. El número que las identifica se encuentra sobre la primera base de la secuencia repetida.

Fig.10.- Análisis de fases de lectura de la región derecha del "cluster" act.

Directo
(izq. >> dcha. según fig.7)



Reverso



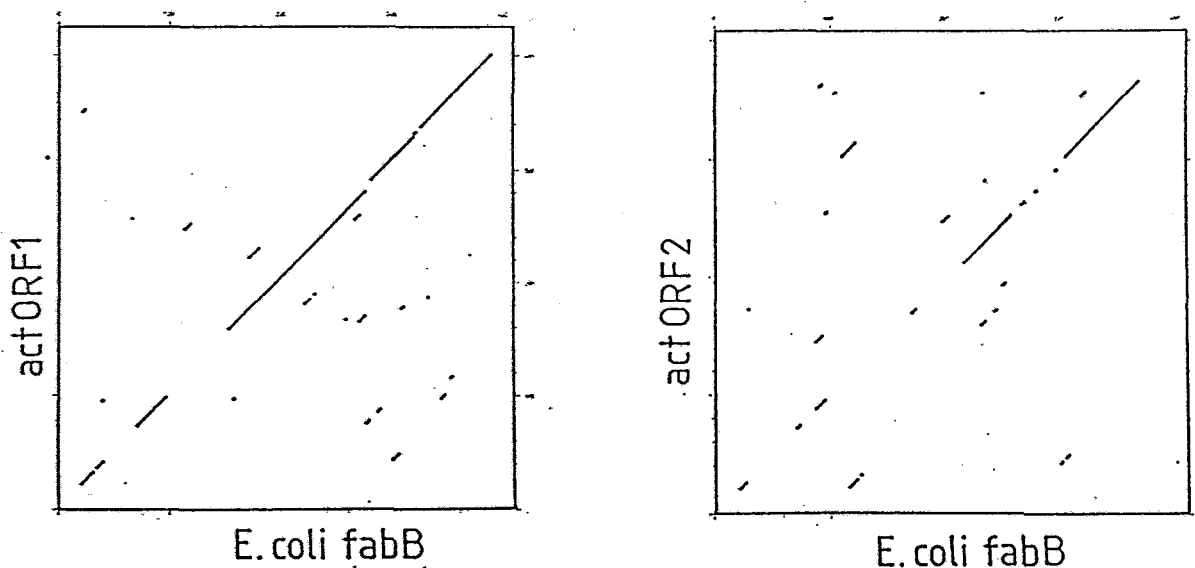
IV.1.1.- Función deducida para las presuntas ORF's de acción temprana y media del "cluster" act.

IV.1.1.1.- actIORF1 y actIORF2.

La comparación por ordenador del presunto producto génico de la actIORF1 (424 aa) con las bases de datos, reveló una alta homología con la *β*cetoacilsintetasa (fabB) de *E.coli* (Kauppinen y col.,1988) (fig.11) y con la región cetoacilsintetasa del enzima ácido graso sintetasa de *S.cerevisiae* (Mohamed y col.,1988). El alineamiento de la actIORF1 con la fabB (406 aa) es extremo-extremo (tamaño similar y homología en las mismas posiciones relativas) (fig.11) y coincidente en el residuo cisteína del centro activo donde presuntamente se ancla la cadena de poli-cetos en la condensación (fig.15, pag.48).

La posterior comparación del presunto producto génico de la actIORF2 (406 aa) con la fabB también reveló una apreciable homología a lo largo de la proteína, pero especialmente en el extremo carboxilo terminal (fig.12). El aspecto más importante en esta comparación es la ausencia del residuo cisteína en la zona equivalente al centro activo de la actIORF2.

Figs. 11 y 12.- Comparación de aa entre la fabB de *E.coli* y las actIORF1 y 2.*



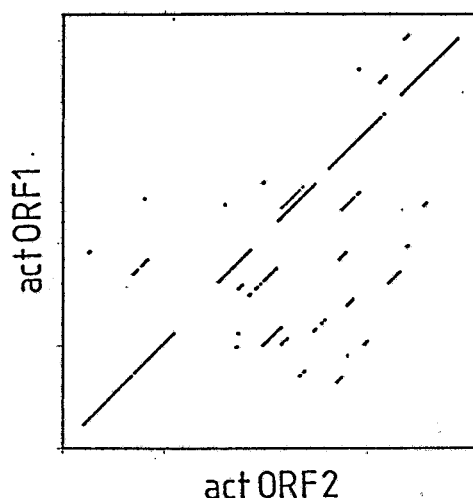
* Los parámetros utilizados fueron : ventana 40; astringencia 19. Esto supone la aparición de puntos cuando la homología es del 47.5%. (para información ver Deveraux y col.,1984)

Comparando las actIORF1 y 2 entre sí, se puso de manifiesto un buen alineamiento extremo-extremo y una importante homología (fig.13, pag.37) entre ambas proteínas. Un aspecto importante a destacar en relación a estas dos ORF's es el aparente acoplamiento traduccional que presentan, sugiriendo una interacción de sus productos génicos para formar un heterodímero que, a su vez, sería parte de un posible complejo "sintetasa de actinorhodina".

Fig. 13.- Comparación a nivel de aa de las actIORF1 y 2.*

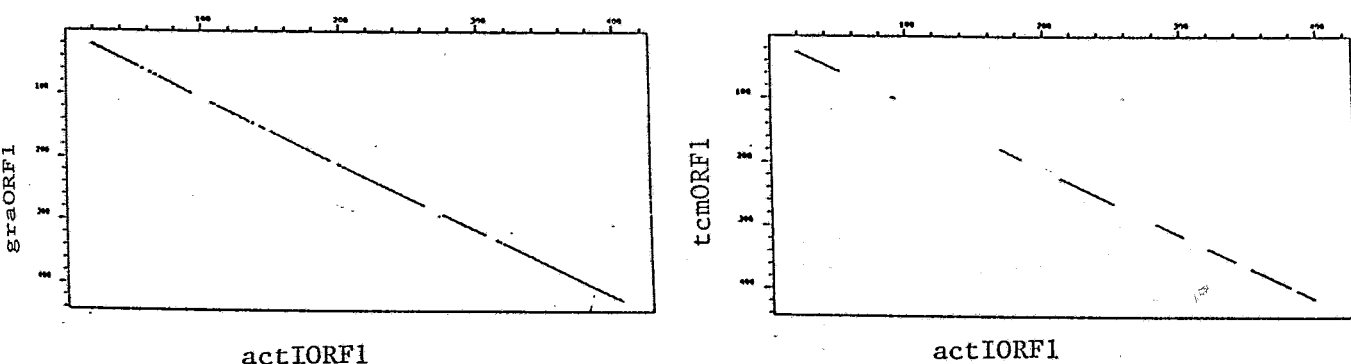
* Parámetros : ventana 40;
astringencia 19.

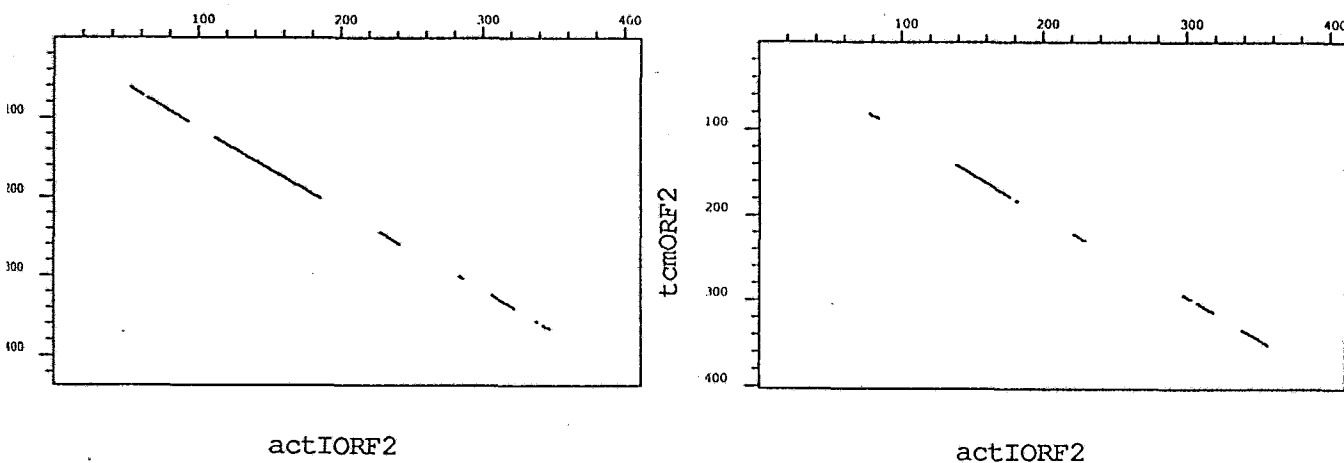
Estas condiciones generan puntos
donde la homología es del 47.5%.
(Déveraux y col.,1984)



Datos anteriores, mostraban la existencia de homología entre algunos de los genes implicados en las primeras etapas de la ruta biosintética de actinorhodina y sus equivalentes en los sistemas de los poliquétidos granaticina (Sherman y col., 1989) y tetracenomicina (Bibb y col.,1989). Esta homología aparecía tanto a nivel de DNA como funcional (Hopwood y col.,1985c; Malpartida y col.,1987; Sherman y col.,1989). La comparación de las actIORF1 y 2 con las respectivas ORF's de los sistemas anteriores reveló una gran semejanza entre ellas : proteínas de tamaño similar (act/gra/tcm : ORF1 424/421/427 y ORF2 406/415/406) y excelentes alineamientos extremo-extremo (fig.14). El alineamiento de aa alrededor del residuo cisteína del presunto centro activo de la actIORF1 con sus equivalentes (fig.15, pag.48) refleja el grado de homología entre las supuestas β cetoacilsintasas de poliquétidos.

Fig. 14.- Comparación a nivel de aa de las act/gra/tcm ORF1 y ORF2.*





* (ventana: 20; astringencia: 14. Estos parámetros reflejan aquellos puntos en que la homología es del 70%. (Deveraux, 1984).

Fig. 15.- Homología a nivel de centro activo entre β -cetoacil sintetasas de varios sistemas.

Centro activo β -cetoacil sintetasas	TcmORF1 ^a	GPVTVVSTGCTSGLD AV
	GraORF1 ^b	GPVTMVSDGCTSGLD SV
	ActIORF1	GPVTMVSTGCTSGLD AV
	Pollo ^c	GPSLTIDTACSSSLM
	E.coli ^d	GVNYSISSACATSAHCI
	S.cerevis ^e	GPIKTPVGACATSVESV
		▲
		Cisteína del centro activo

a) Bibb y col., 1989

b) Sherman y col., 1989

c) Chang y Hammes, 1988

d) Kauppinen y col., 1988

e) Mohamed y col., 1988

IV.1.1.2.- ActIORF3.

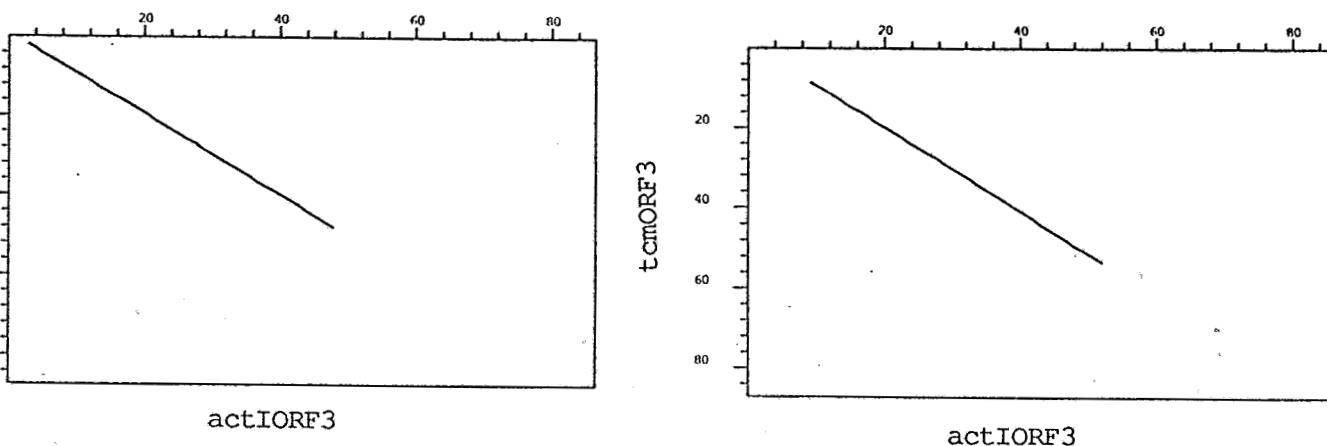
Una característica común a todas las sintetasas de ácidos grasos, cualquiera que sea su origen, es la de poseer una proteína de bajo peso molecular encargada del soporte de la cadena carbonada en elongación y del suministro de los acilos que se le van incorporando por sucesivas condensaciones (Hale y Leadly, 1985; Hale y col., 1987).

El análisis del presunto producto génico de la actIORF3 reveló una proteína de pequeño tamaño, 86 aa, que presentaba una alta homología, especialmente a nivel del presunto centro activo, con proteínas transportadoras de acilos de sintetasas de ácidos grasos de diversos orígenes: bacteriano (Chang y Hammes, 1988), animal (Chang y Hammes, 1988), y de plantas (Kuo y Ohlrogge, 1984) (fig.17, pag.49).

La comparación de la actIORF3 con las correspondientes ACP's de los sistemas granaticina y tetracenomicina reveló una homología muy elevada, mayor que con ACP's de sintetasas de ácidos grasos,

especialmente en la región amino terminal (fig.16). Esta homología, es superior al 83% (10/12) en los 12 aa que rodean el residuo serina, clave del centro activo (fig.17) .

Fig. 16.- Homología a nivel de aa de la ACP de los sistemas gra y Tcm con su equivalente en actinorhodina.*



* Parámetros : ventana 18; astringencia 8. Esto supone la generación de puntos donde la homología es del 45% (Deveraux,1984).

Fig. 17.- Homología entre los presuntos centro activos de ACP de distintos sistemas.

	Saccharopolispora erytrhea	E D L G M D S L D L V E
F.A.	Escherichia coli	E D L G A D S L D T V E
sintetasas	Spinacea oleracea	S K L G A D S L D T V E
	Conejo	A D L G L D S L M G V E
	ActIORF3	E D I G Y D S L A L M E
Sint.	TcmORF3	Q D L G Y D S I A L L E
poliq.	GraORF3	E E L G Y D S I A L M E

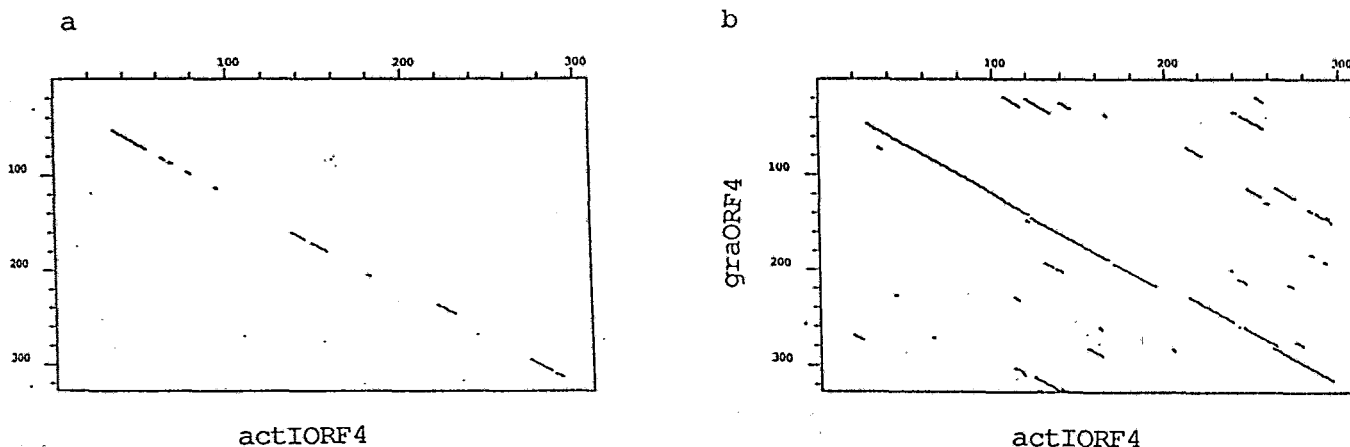


Serina del centro activo

IV.1.1.3.- ActORF4.

La comparación del presunto producto génico de la actORF4 con las bases de datos y con las sintetasas de ácidos grasos conocidas no nos proporcionó ninguna información relevante sobre su posible función. Sin embargo, la comparación con su probable equivalente en el sistema biosintético de granaticina reveló una homología importante (fig.18, pag.50) aunque no tan elevada como la existentes en las ORF's anteriores .

Fig. 18.- Comparación a nivel de aa de la actORF4 y la graIORF4.*



* Parámetros : (a) ventana 20; astringencia 12. Estos parámetros suponen la aparición de puntos donde la homología es del 60%. (b) ventana 18; astringencia 6. Estos parámetros suponen la aparición de puntos donde la homología es del 33.3%. (Deveraux y col., 1984)

El análisis químico había revelado previamente que el paso catalizado por el producto o productos génicos de la clase actVII (Rudd y Hopwood, 1979) podría ser explicado con una deshidratación y ciclación de la cadena de poli-cetos (Floss y col., 1985), elongada por acción del gen actI y reducida en algunos puntos por la acción del gen actIII (fig.5, pag.12). El resultado de estas reacciones sería el esqueleto carbonado básico que, por sucesivas reacciones, se convertirá en el producto final de la ruta. Ello, sugeriría que dicha clase actVII pertenece probablemente al complejo actinorhodina sintetasa, interviniendo en el proceso de ciclación de la cadena de poli-cetos elongada (fig.5, pag.12).

El análisis de complementación por inserción utilizando un derivado del fago PM1 (Malpartida y Hopwood, 1986) portador del fragmento BclI (nucleótidos 2855 al 6921, fig.9, pag.38-42) (es decir, que abarca desde apenas 9 aa del extremo carboxilo terminal de la presunta ACP hasta el interior de la actORF9) resultó positivo sobre la cepa B140 (mutante clase VII). El reducido número de lisógenos que complementaron la mutación, sugirió que la localización de la mutación actVII se encuentra muy próxima al nucleótido 2855, en el extremo amino terminal de la actORF4.

Estos datos en conjunto, sugieren que la sintetasa de actinorhodina estaría formada por, al menos, los productos génicos de las actORF's 1,2,3 y 4 que, junto con el gen actIII (Hallam y col., 1988), supondrían la localización contigua en el "cluster" act de un total de 5 dominios funcionales para constituir el complejo enzimático.

IV.1.1.4.- Probable papel del resto de las ORF's de acción temprana y media

La comparación de los productos génicos de las restantes ORF's secuenciadas (actORF 5, 6, 7, 8 y 9), no sugirió nada relevante sobre la función que puedan desempeñar en la ruta de biosíntesis de actinorhodina.

Datos genéticos ya comentados, asocian claramente esta región con, al menos, dos actividades enzimáticas que definen a las clases actIV y actV_b, sin olvidar que podrían faltar funciones enzimáticas por asignar en la ruta metabólica propuesta (fig.5, pag.12).

La organización transcripcional, deducida del mapeo de S1 de baja resolución, de los genes implicados en las primeras etapas de la ruta (Malpartida, comunicación personal) y la disposición física de las ORF's, resultado de los datos de secuencia, sugería la pertenencia de la actORF6 al mismo mensajero que las ORF's que le preceden y situaba a las actORF7 y 8 en otro mRNA cuya transcripción sería convergente a la del anterior. Mediante experimentos de mutagénesis por inserción se recombinó el fago PM1 con el cromosoma de S.coelicolor a través del fragmento SacII (que contiene secuencias codificantes de las actORF5 y 6; coords.4157-4812, fig.9, pag.40); los lisógenos obtenidos, fueron no productores (E.Martínez, comunicación personal). El carácter mutagénico de ese fragmento sugiere su situación interna a un mensajero, lo que parece confirmar la pertenencia de la actORF6 al mensajero policistrónico involucrado en las etapas tempranas de la ruta biosintética de actinorhodina y que contiene las ORF's mencionadas.

La disposición de las ORF's obtenida a partir de los datos de secuencia, parece situar a la actORF9 en un mensajero físicamente independiente, que estaría probablemente controlado por las mismas señales que determinan la transcripción, divergente, del mRNA que codifica las actORF7 y 8 (fig.10, pag.45).

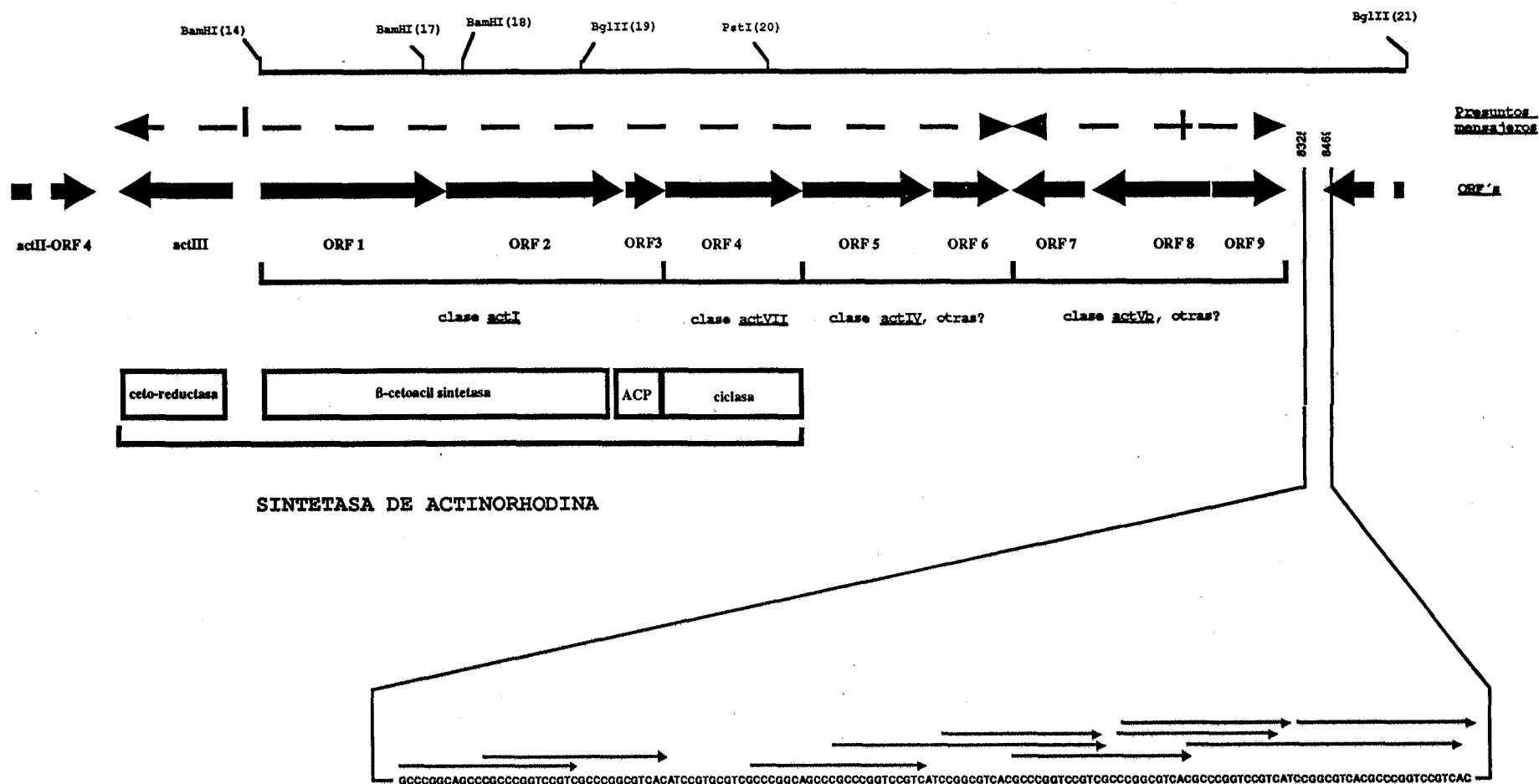
IV.1.1.5.- Posible función de las secuencias especiales no codificantes situadas al final de la actORF9.

A partir del nucleótido 7294 (fig.9, pag.44), 125 pb después del final de la actORF9, aparece una secuencia de 240 pb que contiene una serie de cinco repeticiones directas, algunas solapantes, con una longitud comprendida entre 22 y 37 pb (fig.9, pag.44). Apenas 7 pb después de estas estructuras, vendría el extremo 3' de la ORF10, cuyo mensajero parece transcribirse hacia el resto de los genes del "cluster" mencionados hasta ahora.

La comparación de estas secuencias repetidas con las bases de datos, reveló cierta homología con regiones ricas en G-C de genes implicados en fenómenos de transposición (Gierl y col.,1985; Kunze y Starlinger,1989) y de regiones espaciadoras de genes presentes en varias copias en tándem por cromosoma (Boseley y col.,1979; Moss y col.,1980). También apareció homología con regiones de DNA implicadas en la interacción con proteínas (Kunze y Starlinger,1989). La función de estas secuencias repetidas es aún incierta, pero podrían delimitar uno de los extremos del "cluster".

Así, la organización génica de la región del "cluster" act que codifica para las etapas iniciales de la ruta, quedaría resumida en la figura 19.

Fig. 19.- Esquema general de la región derecha del cluster act.



IV.2.- REGION CENTRAL DEL "CLUSTER" ACT.

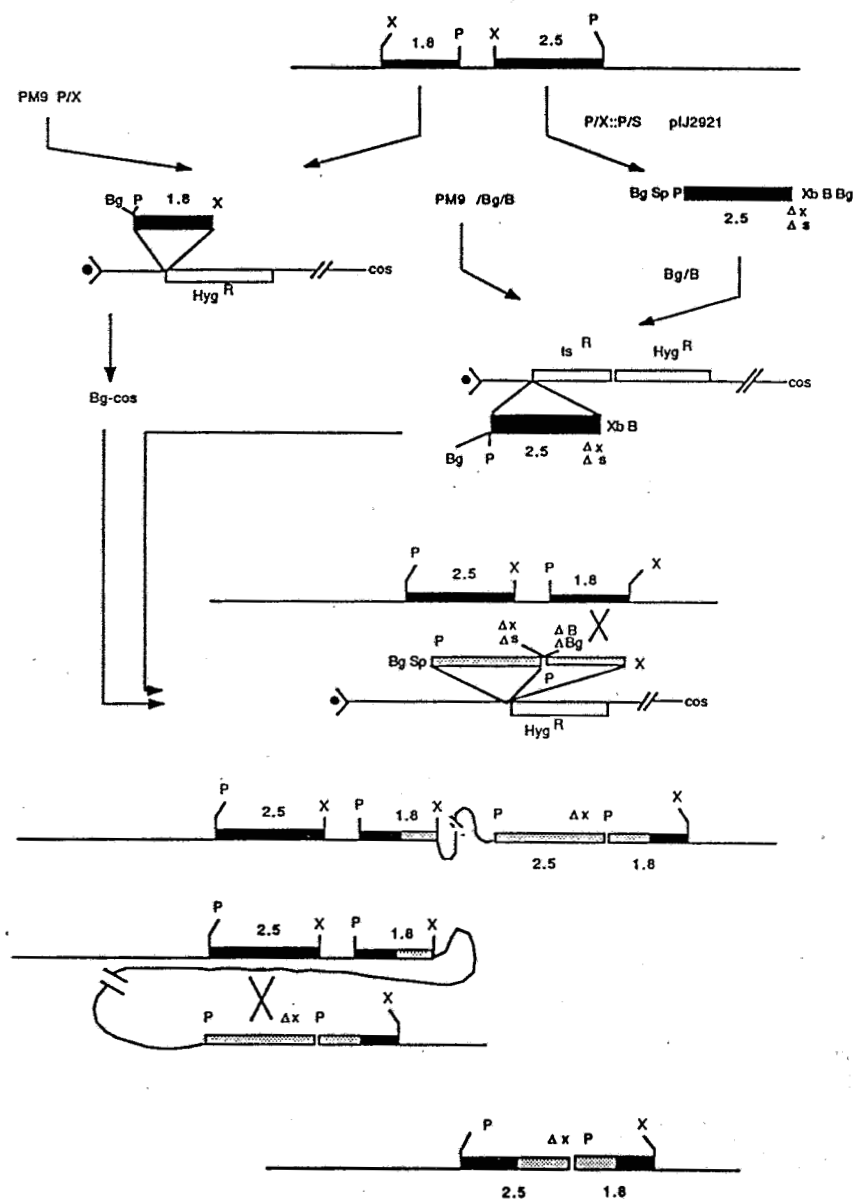
Datos previos a este trabajo obtenidos mediante estudios de cosíntesis (Rudd y Hopwood, 1979) y de complementación (Malpartida y Hopwood, 1986), asociaban una región de aproximadamente 5-6 kb a partir de la coordenada PstI(11) (fig.7, pag.15) con una posible función reguladora de la expresión de los genes del "cluster" act. Los datos genéticos, apuntaban hacia la presencia de un regulador positivo en esta región cuya duplicación en el genoma determinaba unos incrementos en la producción de actinorhodina de dos órdenes de magnitud (Hopwood y col., 1986b). Además, datos de mapeo de S1 de baja resolución revelaban la existencia de dos mensajeros solapantes, de 4 y 4.5 kb, que atravesaban esta región desde aproximadamente 1 kb antes de la coordenada PstI(11) (fig.7, pag.15) (Malpartida, comunicación personal). Paradójicamente, en esta región que parecía transcripcionalmente muy activa, no se habían detectado mutaciones que mapearan sobre estos mensajeros, quedando éstas localizadas entre las coordenadas PstI(12) y el final del gen actIII (fig.7, pag.15). Para explicar estos hechos, se establecieron varias hipótesis: (a) las mutaciones en esta región eran letales, por lo que sería imposible detectar mutantes, (b) la región codificante de los mensajeros de esta región era dispensable para la biosíntesis de actinorhodina y (c) las mutaciones en esta región podría no suponer un cambio fenotípico, con lo que los mutantes serían indistinguibles de los silvestres.

Con el fin de aclarar la posible función de esta región central del "cluster" act, se procedió a la mutagénesis por inserción inactivante. Para ello, se construyó un fago recombinante derivado del KC516 portando la región de aproximadamente 900 pb a partir de la coordenada PstI(11) (fig.7, pag.15) y se lisogenizó la cepa productora de actinorhodina S.coelicolor J1501. Sorprendentemente, el fenotipo del lisógeno resultante, fue idéntico al de la cepa original: productor de actinorhodina. Una posible interpretación de este resultado, aparentemente inesperado, fue la existencia de una posible actividad promotora desde el fago que reconstituyera el efecto de la disrupción, como se había detectado en estudios anteriores de mutagénesis sobre mRNA's policistrónicos (Malpartida y Hopwood, 1986).

Para tratar de aclarar esta posibilidad, procedimos a delecionar del cromosoma de la cepa de S.coelicolor B385 (silvestre para actinorhodina) la misma región utilizada en el clonaje mutacional. La estrategia seguida, se presenta en la figura 20 (pag.54): clonamos en el fago PM1 (Malpartida y Hopwood, 1986) las regiones flanqueantes al fragmento a delecionar, lisogenizando con él la cepa parental. Forzando una doble recombinación, pretendíamos sustituir la región original del cromosoma por la clonada en el fago, portadora de la delección. Tras dos pasos sucesivos del lisógeno sobre un medio sin presión selectiva para los marcadores del fago, obtuvimos 3 colonias, de 2500 analizadas, que habían perdido dichos marcadores y que no liberaban fago sobre placas de DNA. El análisis mediante Southern del DNA cromosómico de estas colonias, reveló que tan solo una de ellas era el derivado de la cepa S.coelicolor B385 con el fragmento PstI/XhoI delecionado que buscábamos (fig.21, pag.55).

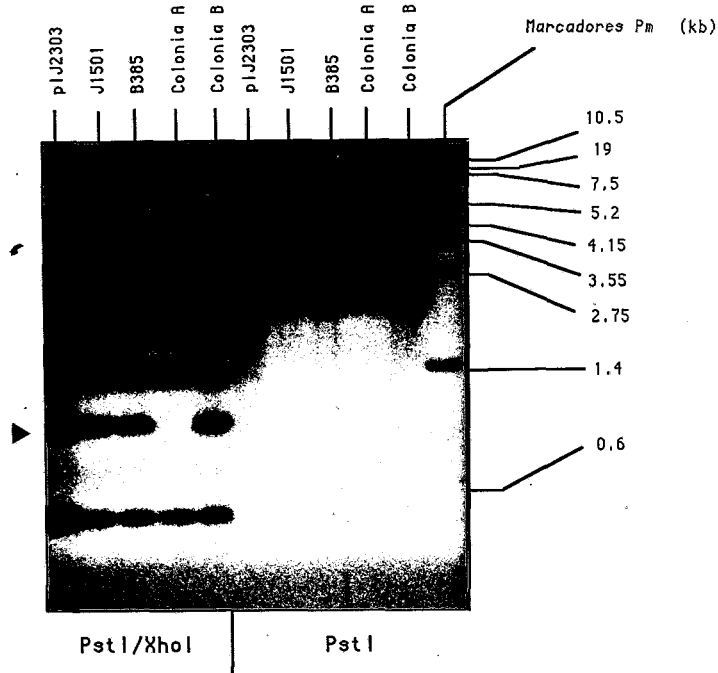
El fenotipo de la cepa resultante era exactamente igual al salvaje: no había pérdida de producción de pigmento azul, sugiriendo que las secuencias internas a los mensajeros detectados en esta región, parecían dispensables para la biosíntesis de actinorhodina.

Fig. 20.- Estrategia desarrollada para generar la delección del fragmento PstI/XhoI, central al "cluster" *act*, en *Streptomyces coelicolor*.



B385 Δ Pst/xho 0.8 Kb

Fig. 21.- Detección de la delección del fragmento PstI/XhoI de la región central del "cluster" *act*.



Estos resultados nos llevaron a tratar de buscar una explicación a través del análisis de la secuencia de DNA.

IV.2.1.- Secuenciación y análisis de la región central del "cluster" *act*.

Los resultados obtenidos con los experimentos de delección, parecían sugerir que el presunto regulador positivo del "cluster" *act* estaría codificado fuera de la región de los mensajeros detectados anteriormente (Malpartida y Hopwood, 1986) (fig.7, pag.15); además, su transcripción había de ser independiente puesto que mutaciones sobre esos mensajeros no originaban el fenotipo no productor típico de los mutantes *actII* descritos (Rudd y Hopwood, 1979). Estos resultados, sugerían que la región central del "cluster" *act* podría subdividirse en dos zonas :

(a) una región de aproximadamente 4 kb a partir de la coord.PstI(11) (fig.7, pag.15), de transcripción activa pero aparentemente dispensable.

(b) una región más pequeña, imprescindible para la expresión del "cluster", donde se localizaría el presunto gen activador que estaría situada entre los mensajeros descritos para la región central del "cluster" y el gen *actIII* flanqueando las coordenadas PstI(12) y BamHI(13), fig.7, pag.15)

Con el fin de conocer con mayor profundidad la estructura y organización del "cluster" en esta región tan importante, decidimos abordar su secuenciación en colaboración con el grupo del prof. D.A.Hopwood del John Innes Institute (UK).

La secuenciación de la región central del "cluster" act fue realizada por nosotros desde la coordenada PstI(11) hasta el final del gen actIII (Hallam y col.,1988) (fig.7, pag.15), mientras que el grupo con el que colaboramos lo hacía en sentido contrario. La estrategia de secuenciación utilizada, se describe en la figura 22.

Fig. 22.- Estrategia de secuenciación de la región central del "cluster" act.

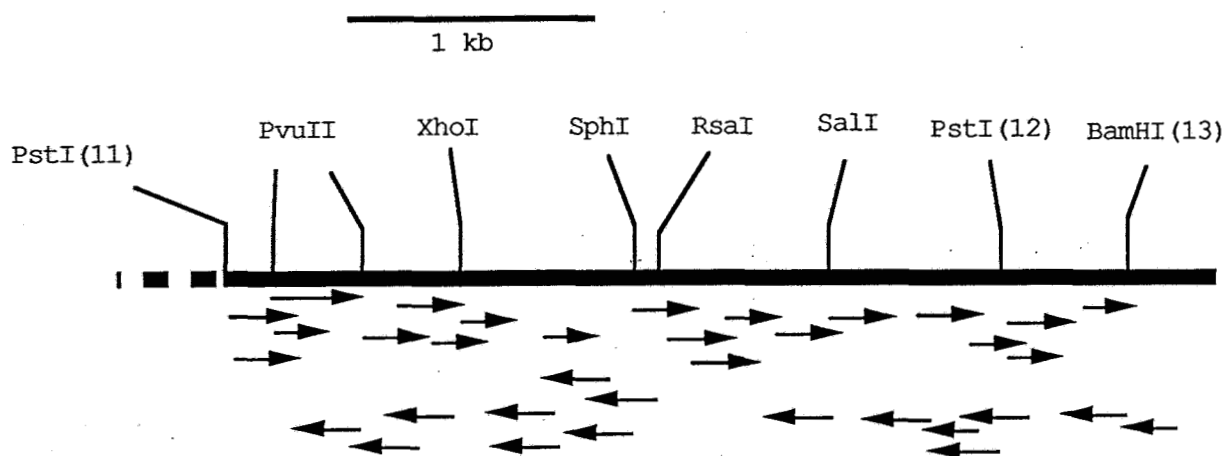


Fig.23.- Secuencia de nucleótidos de la región central del "cluster" act.

```

1  CGTTCGTGGACCAATAGTCGAGGACCCGGGGGACGCCATGAGTTCCGTTGAAGCCGACGA  60
    actIIORF2 >>  rbs?    rbs?    M S S V E A D E

61  GCCGGACAGGGCCACGGCCCCGCCGTCGGCGTTACTGCCCGAGGACGGCCCCGGACCGGA  120
    P D R A T A P P S A L L P E D G P G P D

121 CGGAACCGCGGGCCGGACCCCGCCCTACGCGCGCGTTGGGCGCGCTGGGAGTCATCCT  180
    G T A A G P P P Y A R R W A A L G V I L
  
```

181 CGGCGCCGAGATCATGGACCTGCTCGACGGCACGGTCATGAACGTGGCCGCGCCCGCCGT 240
 G A E I M D L L D G T V M N V A A P A V

241 CCGCGCGGACCTGGGCGGCAGCCTCAGCGTCATCCAGTGGATCACCGTCGGGTACACGCT 300
 R A D L G G S L S V I Q W I T V G Y T L

301 CGCGTTCGCCGTCTGCTCGTGGTGGGCGGCCGGCTGGGCGACATCTACGGCCGCAAGCG 360
 A F A V L L V V G G R L G D I Y G R K R

361 CATGTTCTGTCGTCGGCGCCGTCTGGCTTACCGCGGCCTCCGTGCTGTGCTCGGTGGCGGC 420
 M F V V G A V G F T A A S V L C S V A A

421 CGGTCCCAGATGCTCACCGCGGCACGCTTCTTCAGGGCGGGCTCGGCGCGCTGATGAT 480
 G P E M L T A A R F L Q G G L G A L M I

481 TCCGCAAGGGCTCGGTCTCATCAAGCAAATGTTCCCGCCCAAGGAGACGGCGGGCGGCGTT 540
 P Q G L G L I K Q M F P P K E T A A A F

541 CGGCGCGTTTCGGACCCGCCATCGGGCTGGGCGCCGTGCTCGGCCCGATCGTCGCCGGGT 600
 G A F G P A I G L G A V L G P I V A G F

SalI.
 601 CCTGGTCGACGCCGACCTGTTCCGGCACGGGCTGGCGGTCCGTCTTCTGATCAATCTGCC 660
 L V D A D L F G T G W R S V F L I N L P

661 GATCGGCGTGGCCGTGATCGTCGGCGCGGTCTGCTGCTGCCCCAGGGCAAGGCGCCCGT 720
 I G V A V I V G A V L L L P E G K A P V

721 GCGGCCGAAGTTCGACGTCGTCGGCATGGCGCTGGTGACGTCCGGGCTCACCTGCTCAT 780
 R P K F D V V G M A L V T S G L T L L I

781 CTTCCCGCTCGTCCAGGGGCGCGAACCGGGCTGGCCCGCTGGGCGTTCTGCTGATGCT 840
 F P L V Q G R E R G W P A W A F V L M L

841 GGCCGGAGCGCCGTGCTCGTCGGCTTCGTGCCCCACGAACTGCGGCAGGAGAGGCGCGG 900
 A G A A V L V G F V A H E L R Q E R R G

901 CGGCGCCACGCTCATCGAGCTCAGCCTGCTGCGCAGGTCCCGCTACGCCGCGGGACTGGC 960
 G A T L I E L S L L R R S R Y A A G L A

961 GGTGGCACTGGTGTCTTTCACCGGCGTCTCCGGAATGTCGCTGCTGCTCGCCCTGCACCT 1020
 V A L V F F T G V S G M S L L L A L H L

PstI(11)
 1021 GCAGATCGGCCTGGGCTTCAGCCCCACCAGGGCCGCGCTGACCATGACGCCCTGGTCGGT 1080
 Q I G L G F S P T R A A L T M T P W S V

1081 GTTCCTCGTCGTCGGCGCGATCCTGACCGGGGCGGTGCTGGGATCGAAGTTCGGCCGCAA 1140
 F L V V G A I L T G A V L G S K F G R K

1141 GGCCCTGCACGGCGGGCTCGTGGTGTGGCGCTGGGCGTGTGATCATGCTGTTGAGGAT 1200
 A L H G G L V V L A L G V L I M L L R I

1201 CGGCGACCGCCGGCGGGCTGACCAGCTGGGAGCTCGTCCCCGGTATCGCCGTTGCCGG 1260
 G D Q A G G L T S W E L V P G I A V A G

1261 GCTCGGCATGGGCATCATGATCGGACTGCTCTTCGACATCGCCCTGGCCGACGTCGACAA 1320
 L G M G I M I G L L F D I A L A D V D K

1321 GCAGGAGGCCGGTACCGCCTCCGGCGTCTCACC CGGTCCAGCAGCTCGGCTTCACCGT 1380
 Q E A G T A S G V L T A V Q Q L G F T V

1381 GGGCGTCGCGGTGCTCGGGACCCTGTTCTTCGGGCTGCTCGGCTCACAGGCCACGGCGAG 1440
 G V A V L G T L F F G L L G S Q A T A S

1441 CGTCGACGACGGCGCGAGCCGGGCCCGCACCGAACTCGCCGCCCGGGGCGAGCAGCAG 1500
 V D D G A S R A R T E L A A A G A S T T

1501 CGAGCAGGACCGGCTCCTGGCCGACCTGCGGGTGTGCCTGCGGGAATCGGCGAGTCAGCA 1560
 E Q D R L L A D L R V C L R E S A S Q Q

1561 PvuII
 GGA CTCCGAACGGACGCCGGACGCTGCCGAAACCTCCAGCAGGCCCGGGCGGGTGGC 1620
 D S E R T P D S C R N L Q Q A R P A V A

1621 CGAGGCCACGGCGCGGGCCTGGCGGACGGCCACACCGAGAACTTCAGCACCGCGATGGT 1680
 E A T A R A W R T A H T E N F S T A M V

1681 CCGCACGCTCTGGGTGGTGATCGCACTGCTGGCGGTCTCCTTCGCGCTGGCCTTCCGGCT 1740
 R T L W V V I A L L A V S F A L A F R L

1741 GCCGCCCAAGCCGCGTGAGGAAGAGGGCTTCTGATGACACGCACACTGCTGTCCTGGCCC 1800
 P P K P R E E E G F * *
 rbs's? M T R T L L S W P
 actIIORF3 >>

1801 GGCGGACGCCGGCTCAAGTGGCTGGTGTCTCGGCGCTGGATCGGTCTGCTGATCGTGCTC 1860
 G G R R L K W L V L A A W I G L L I V L

1861 CAGCCGCTGGCAGGGAAGCTCGGCGACGTCGAGTCCAACGACGCCGCCGCTGGCTCCCC 1920
 Q P L A G K L G D V E S N D A A A W L P

1921 GGCAATGCGGAGTCGACCGAAGTGCTCGAGCTGTCCGAGAAGTTCCAGCCGGCCGACACC 1980
XhoI.
 G N A E S T E V L E L S E K F Q P A D T

1981 AGCCCGACCGTGATCGTCTACGACCGCCCGTCCGGGATCACGGCCGCCGACGAGGCGAAG 2040
 S P T V I V Y D R P S G I T A A D E A K

2041 GCGCGGGCCGACGCCACGCACTTCGCGGACGGCACC GG TGTGGTGGGCGAGCCCTACGGC 2100
 A R A D A T H F A D G T G V V G E P Y G

2101 CCGGTGCGCTCGGACGACGCAAGGCCCTGCGCACCGTCGTCAACGTCCACCTCGGCAAG 2160
 P V R S D D G K A L R T V V N V H L G K

2161 GACGGCTGGGAGGGGCTCAACGCGGCCGGAAGGACAATGCGGCGATCGCCCGGCCGAGC 2220
 D G W E G L N A A A K D N A A I A R P S

2221 GCCCCGACGGTCTCGGCGTCCACGTACGGGTCCGACCGGTTACGCCGCCGATTCCGCA 2280
 A P D G L G V H V T G P T G Y A A D S A

2281 GAGTCCTTCAGCAGCGCCGACTTCAAGCTCACCCCTGGTCACCCTCCTCATCGTCGTGACG 2340
 E S F S S A D F K L T L V T L L I V V T

2341 ATCCTCGTCGTCACCTATCGCAGTCCCTTGCTCTGGCTGCTGCCGATGATCTCCGCGGGC 2400
 I L V V T Y R S P L L W L L P M I S A G

2401 ATGTCCCTGGTCATCTCGCAGGCCATCGTCTACCTGCTGGCCAAGAACGCGGGACTCACG 2460
 M S L V I S Q A I V Y L L A K N A G L T

2461 GTCAACGCCCAGACGGCGATGATCCTCACGGTCTGGTGCTCGGCGCGGCCACCGACTAC 2520
 V N A Q T A M I L T V L V L G A A T D Y

2521 GCGCTGTTGCTCGTCGCCCCGCTACCGCGAGGAGCTGCGGCGGCACGAGGACCGGCACGAG 2580
 A L L L V A R Y R E E L R R H E D R H E
 2581 GCCATGGCCGTGGCGCTGCGCCGGGCGGTCCCGCCATCGTGGCCAGCGCCGCCACCGTC 2640
 A M A V A L R R A G P A I V A S A A T V
 2641 GCCGTCAGCATGCTCGTCCTGCTGCTGGCCGCTCTGAACTCCACCAAGGGTCTCGGCCCG 2700
 A V S M L V L L L A A L N S T K G L G P
 2701 GTCTGCGCCCTCGGCGTGCTGGTCGGCCTGCTGTCGATGATGACGTTGCTGCCCCGCCCTG 2760
 V C A L G V L V G L L S M M T L L P A L
 2761 CTGGTGATCTTCGGACGCTGGGTCTTCTGGCCGCCCCGGCCGAAGCACGGTACGGAGCCC 2820
 L V I F G R W V F W P P R P K H G T E P
 2821 GACGTCACCCGGGGTCTGTGGTCGCGGATCGCCCGGCTGGTGTCCGGCCGTCCGCGTGCC 2880
 D V T R G L W S R I A R L V S G R P R A
 2881 GTCTGGGTCAACCACGACCTGCTGCTGGGGGCGGTGGCCACGCTGGCCGTACCCCTGAAC 2940
 V W V T T S L L L G A V A T L A V T L N
 2941 GCCGACGGCCTCCAGCAGAAGGACGTTTCAAGACCAAGCCGGAGTCGGTGGTGGGCGAG 3000
 A D G L Q Q K D G F K T K P E S V V G E
 3001 GAGATCCTGACCCGGCACTTCCCGGCCGGCTCCGGTGAACCCATGGTCGTCATCGCCAAG 3060
 E I L T R H F P A G S G E P M V V I A K
 3061 GGCGCCTCGGCGGACCAGGTGCACGCAGCTCTGGAGACCGTGCCCGGCGTCATCGAGGTC 3120
 G A S A D Q V H A A L E T V P G V I E V
 3121 GCACCACCACAGGTGAAGGACGGCCTCGCCTATGTCGAGGCGACGCTCGGCGCCGGGGCG 3180
 A P P Q V K D G L A Y V E A T L G A G A

3181 GACTCGCCGGCGGCCATGCGTTCGGTCACCGCGGCCCGGAGACACTCGCCCGGCTGGAC 3240
 D S P A A M R S V T A A R E T L A R L D

3241 GGTGCGCAGGCACGGGTGGGCGGCAGCAGCGCCGTCGTGCACGACATGCGGGAGGCGTCC 3300
 G A Q A R V G G S S A V V H D M R E A S

3301 AGCCGCGACCGCGGTCTGATCATTCCGGTGATCCTCGCCGTGGTGTCTGCATCCTCGCG 3360
 S R D R G L I I P V I L A V V F C I L A

3361 CTGCTGCTGCGAGCACTGGTGGCGCCGCTGCTGCTGATCGCGAGCGTGGTGTCTCTCTC 3420
 L L L R A L V A P L L L I A S V V L S F

3421 TTCACCGCGCTCGGCCTCGCCGCCCTCTTCTTCAACCACGTCTTCGACTTCGCGGGAGCC 3480
 F T A L G L A A L F F N H V F D F A G A

3481 GATTCGGCCTTCCCCCTGTGGGTCTTCGTCTTCTGCTCGCCCTGGGCGTCGACTACAAC 3540
 D S A F P L W V F V F L V A L G V D Y N

3541 ATCTTCCTCGTCACCCGATCAAGGAGGAGAGCGACCGGCTCGGCACCCGGCAGGGCGCG 3600
 I F L V T R I K E E S D R L G T R Q G A

3601 CTCAAGGGCCTCACCTCGACCGGTGGCGTGATCACCGCGGCCGGGCTGGTGTGGCCGGG 3660
 L K G L T S T G G V I T A A G L V L A G

3661 ACCTTCGCCGCGCTGGCCACGCTGCCGCTGGTCTTCATCGCCGAGCTCGGATTCACGGTC 3720
 T F A A L A T L P L V F I A E L G F T V

3721 GCGGTGGGCGTCCTGCTCGACACCATGATCGTGCGATCGGTCTGCTGTCACCGCGCTCACT 3780
 A V G V L L D T M I V R S V L V T A L T

3781 CTCGATGTCGGCCGGTGGATGTGGTGGCCGCACCCGCTCGCCCGGCGCGAGGACCCTTCC 3840
 L D V G R W M W W P H P L A R R E D P S

3841 GAGGACCCAGCCGTATCAGGAATGCCAGATTCTATTGATTGCGAAGCCTCGACCACTGCC 3900
E D P A V S G M P D S I D S E A S T T A

3901 TCTCGGTAAATCCAGCAAAAATTAATCAGTGCAGCTCGCTGCACTGATTAATTTTGGAT 3960
S R *

3961 CAATAGGAGATCGCTTGTGACGGCAAGCACATTGAAATCTGTTGAGTAGGCCTGTTATTG 4020

4021 TCGCCCCCAGGAGACGGAGAACTCTCGACGGGGGCGCAGATGAGATTCAACTTATTGGGAC 4080
rbs's ? rbs? M R F N L L G R

4081 GTGTCCATGTAATCACCGATGCGGGATGTGTAATTCGCTTAAATCCTCGAAGGCGACCC 4140
V H V I T D A G C V I P L K S S K A T Q

4141 AGCTCCTGGTGCTGCTGCTCCTCAGGCGGCACGAGGTGGTGGGATCGGGGGTGCTCATCG 4200
L L V L L L L R R H E V V G S G V L I E

4201 AGGAGTTGTGGGCGGACCACCCGCCCCGCGAGCGCCATGACGACGCTGCAGACGTACGTGT 4260
AvaII PstI(12)
E L W A D H P P R S A M T T L Q T Y V Y

4261 ACCACACCCGCCGGCTGCTGGGGGAGCACCGGGTGACGAGCGACGACCGGGAATTGGTCC 4320
H T R R L L G E H R V T S D D R E L V L

4321 TGACCCAGCCGCCCGGCTACTTCGCCCTGATCGACGAGGACGAACTCGACGTGCGGGTCG 4380
T Q P P G Y F A L I D E D E L D V A V A

4381 CCGAGCGTCTGATCCGCACCGGCGGCCGGCTGCTCGAGGAGAACCGGCTCGAGGAGGCGC 4440
E R L I R T G G R L L E E N R L E E A L

4441 TCGCCTCGTTGGACGCGGGACTGGATCTCTGGCGAGGCCCGGCGCTGTCCACCGTACCGT 4500
A S L D A G L D L W R G P A L S T V P C

4501 GCGGCCGGGTGCTCGAAAGCAATATCGCGCACCTGGAAGAGCTGCGGCTTTTGGGAATGC 4560
G R V L E S N I A H L E E L R L F G M Q

4561 AGCTCCGTATCGACGCGAATTGGCGGCTGGGCAGAATAGGGCCGATGATTCCGGAATCC 4620
L R I D A N W R L G R I G P M I P E L R

4621 GGTCCCTGGTAATTTTCGCATCCGCTGAACGAGACCCTGCACGCCAACTGATGGGCGCGC 4680
S L V I S H P L N E T L H A K L M G A L

4681 TCTGTCAGATGGGCAGGCGCGCCGAGGCGCTGGAATCGTATCGGAATCTCCGGCGGATAC 4740
C Q M G R R A E A L E S Y R N L R R I L

BamHI (13)

4741 TGTCCGACGAACTGGGGGTGGATCCGACGCCGGAATCCAGCGTATGCACATGGAAATTC 4800
 S D E L G V D P T P E I Q R M H M E I L

4801 TCAACGGTGAGAAGGTGCTCGTGTAGCACCGGTCCGTGAACGCGGTGGAGCCCCTCGCAG 4860
 N G E K V L V

4861 CCTGCGAGGGGCTCCACCGCGTTCACGGACCGGCCGCGTCAGTAGTTCCTCCAGCCCGCC 4920

BsteII

4921 GCAGACGTTTCAGCGCCTGCGCGGTGACCGCGGCCGACCGGGCCCGATCAGGTACGCCAC 4980

4981 CATCTCCGCCACCTCGGACGGCTGCAC 5007

→ Parada de transcripción del gen actIIORF4

→ Inicio de transcripción del gen actIIORF4

>> dirección de transcripción

El número entre paréntesis situado junto a algunos sitios de restricción, hace referencia a la coordenada de dicho sitio en la figura 7, pag.15.

La coordenada Sali(5057) a la nos referiremos en varias ocasiones, no aparece en la figura por no tener más relevancia que como herramienta de clonaje

↔ Secuencias inversamente repetidas

IV.2.1.1.- Región dispensable definida por las actIIORF's 2 y 3.

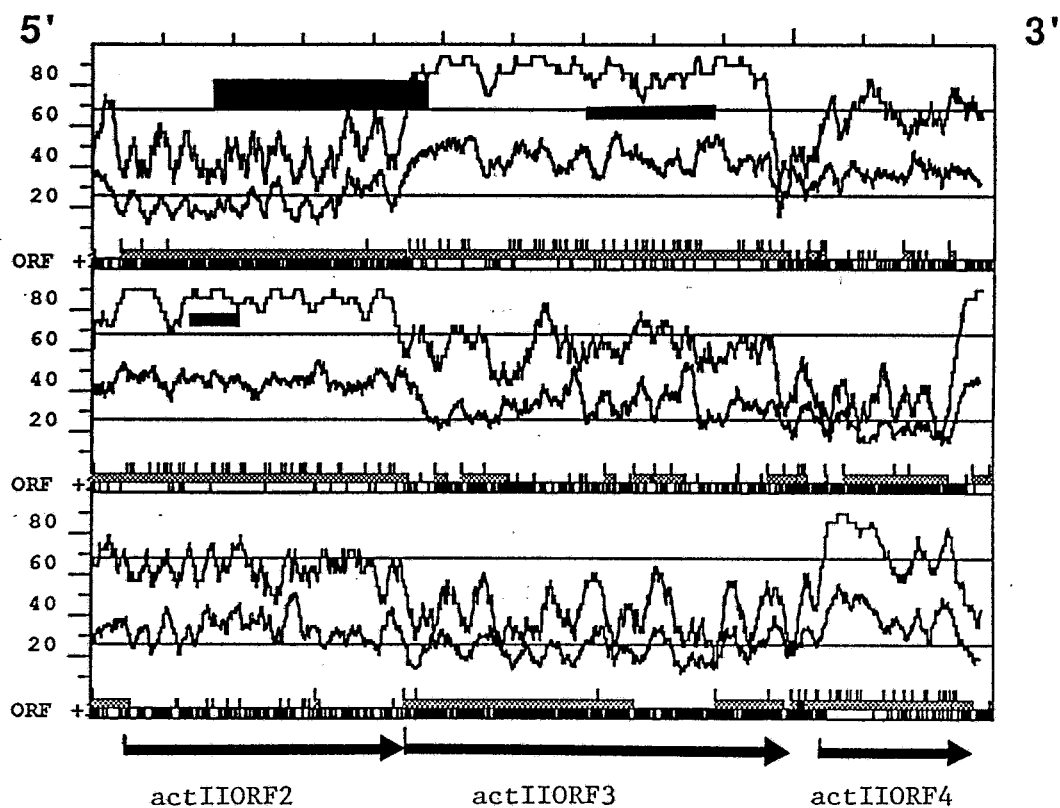
La actIIORF2 (1736 pb/ 578 aa), comenzaría con un ATG (nucleótido 38; fig.23), precedido por dos posibles sitios de unión del ribosoma a 5 y 14 pb respectivamente, y terminaría en un TGA (nucleótido 1772) solapando con la ORF siguiente en una inusual disposición TGATGA, con dos codones de terminación en tándem que generan uno de iniciación en diferente fase.

La comparación del presunto producto del gen actIIORF2 con las bases de datos reveló una alta homología con genes de resistencia a tetraciclina de distintos orígenes (McMurry y col.,1980), por lo que se asoció este gen con el de la resistencia a actinorhodina, y se sugirió la posibilidad de que pudieran presentar mecanismos de acción y regulación similares. Esta hipótesis, se vió reforzada al haber sido encontrada por el grupo del profesor Hopwood una ORF (actIIORF1) a la izquierda de la actIIORF2, de transcripción divergente a ésta, cuyo producto génico posee una elevada homología a nivel de proteína con un presunto represor del gen de resistencia a tetraciclina (J.L.Caballero, comunicación personal)

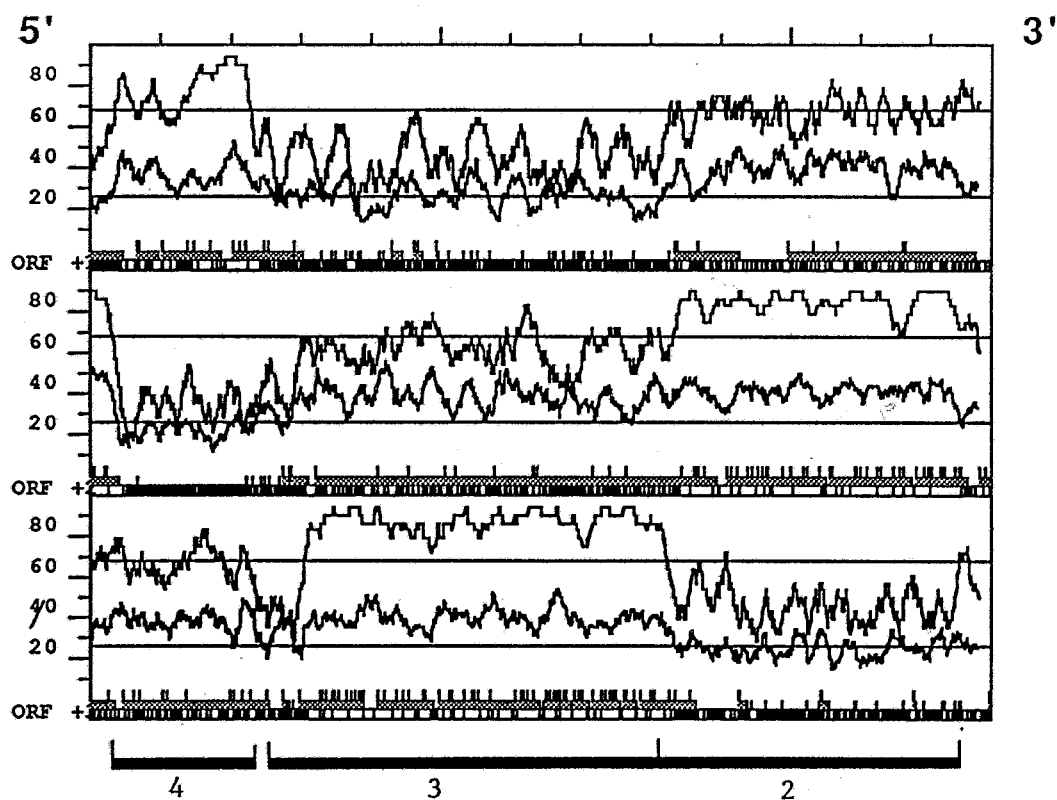
Fig. 24.- Análisis de fases de lectura de la región central del "cluster" *act*.

Directo

(izq. >> dcha. según fig.7)



Reverso



delección

inserción

Un dato de interés a señalar es la presencia en la actIIORF2 de un codón TTA, de escasa incidencia en los genes de Streptomyces (tabla 3, pag.8), 54 pares de bases después y en fase con el presunto codón de iniciación. La lectura de este codón TTA por el producto del gen bldA (Lawlor y col.,1987), podría estar implicada en la regulación a nivel de traducción de la expresión de la posible resistencia a actinorhodina.

La actIIORF3 (2135 pb) tendría un potencial sitio de unión del ribosoma 6 pb antes del ATG de inicio de traducción (nucleótido 1774) y terminaría con un codón TAA (nucleótido 3907), 7 pb antes del inicio de una estructura del tipo "stem-loop" rica en A-T que precede a la actIIORF4 (fig.23, pag.62).

La comparación del presunto producto génico de la actIIORF3 frente al banco de datos, no reveló homologías significativas que nos permitiera asociar este gen a alguna función dentro de la ruta de biosíntesis de actinorhodina.

Una vez obtenidos los datos de secuencia, pudimos comprobar que la delección que habíamos generado eliminaba del extremo carboxilo del presunto gen de resistencia 249 de los 578 aa totales (el 43%) y 56 aa del extremo amino de los 711 que constituyen la actIIORF3 (cerca del 8%. Fig.23, pags.56-63; fig.24, pag.64).

Para comprobar si la delección no había afectado una zona funcionalmente importante de los dos genes afectados, procedimos a realizar una mutagénesis por inserción sobre la cepa S.coelicolor J1501 en las regiones flanqueantes a la delección. Para la mutagénesis del gen de resistencia (actIIORF2), clonamos el fragmento de 414 pb SalI/PstI (nucleótidos 605/1019, figs.23,24) en el fago PM1 (Malpartida y Hopwood,1986); el lisógeno obtenido resultó productor, apoyando la hipótesis de que este gen es dispensable para la producción de actinorhodina. Para la mutagénesis de la actIIORF3, utilizamos el fragmento RsaI/SalI (nucleótidos 2809/3528; figs.23,24) para lisogenizar con el mismo fago, obteniendo también como resultado un fenotipo productor, apoyando la hipótesis de la dispensabilidad de esta ORF para la biosíntesis de actinorhodina.

Así pues, la actIIORF2 y actIIORF3 parecen dispensables para la producción de actinorhodina.

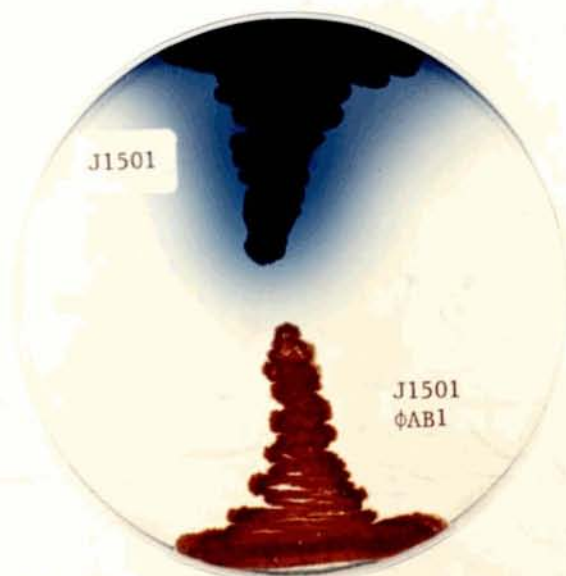
IV.2.1.2.- Región codificante del regulador positivo del "cluster" act.

Los estudios de complementación previos habían localizado la mayor parte de las mutaciones en regulación descritas (clase actII) entre la coordenada PstI(12) y el final del gen actIII (fig.7, pag.15) (Malpartida y Hopwood,1986), es decir, en el extremo derecho de la región central del "cluster", sobre el que hemos detectado la actIIORF4. Esto, sugiere que el presunto gen regulador positivo del sistema act es el especificado por esta ORF. La complementación de la cepa S.coelicolor JF1, mutante de la clase actII de S.coelicolor, por el fago øAB2 (tabla 6, pag. 88) localizó esta mutación a la izquierda de la coordenada BamHI(13) (fig.7, pag.15), confirmando la relación entre la actIIORF4 y el gen regulador del sistema.

El análisis de la secuencia de la actIIORF4 (fig.24, pag.64), permitió distinguir dos zonas en lo que parece ser el presunto gen regulador : una anterior, con un buen uso de codones y un alto contenido en G-C, seguida de otra con abundancia de codones poco frecuentes en los genes de *Streptomyces* y un contenido en G-C relativamente pobre. Así mismo, la actIIORF4, está flanqueada por dos estructuras del tipo "stem-loop" (fig.23, pags.62-63), la más próxima al extremo amino terminal, con un $\Delta G = -44$ kcal/mol, es muy rica en A-T mientras que la situada junto al carboxilo terminal, con un $\Delta G = -80$ kcal/mol, es muy rica en G-C y parece ser utilizada como señal de parada de transcripción del gen *actIII* (Hallam y col,1988). La primera de estas estructuras, tendría un brazo de 19 pb de longitud y 2 pb en el giro (fig.23) y en ella están presentes 2 de los presuntos 17 sitios de reconocimiento de la enzima AseI (ATTAAT) que existen en el genoma completo de *S.coelicolor*.

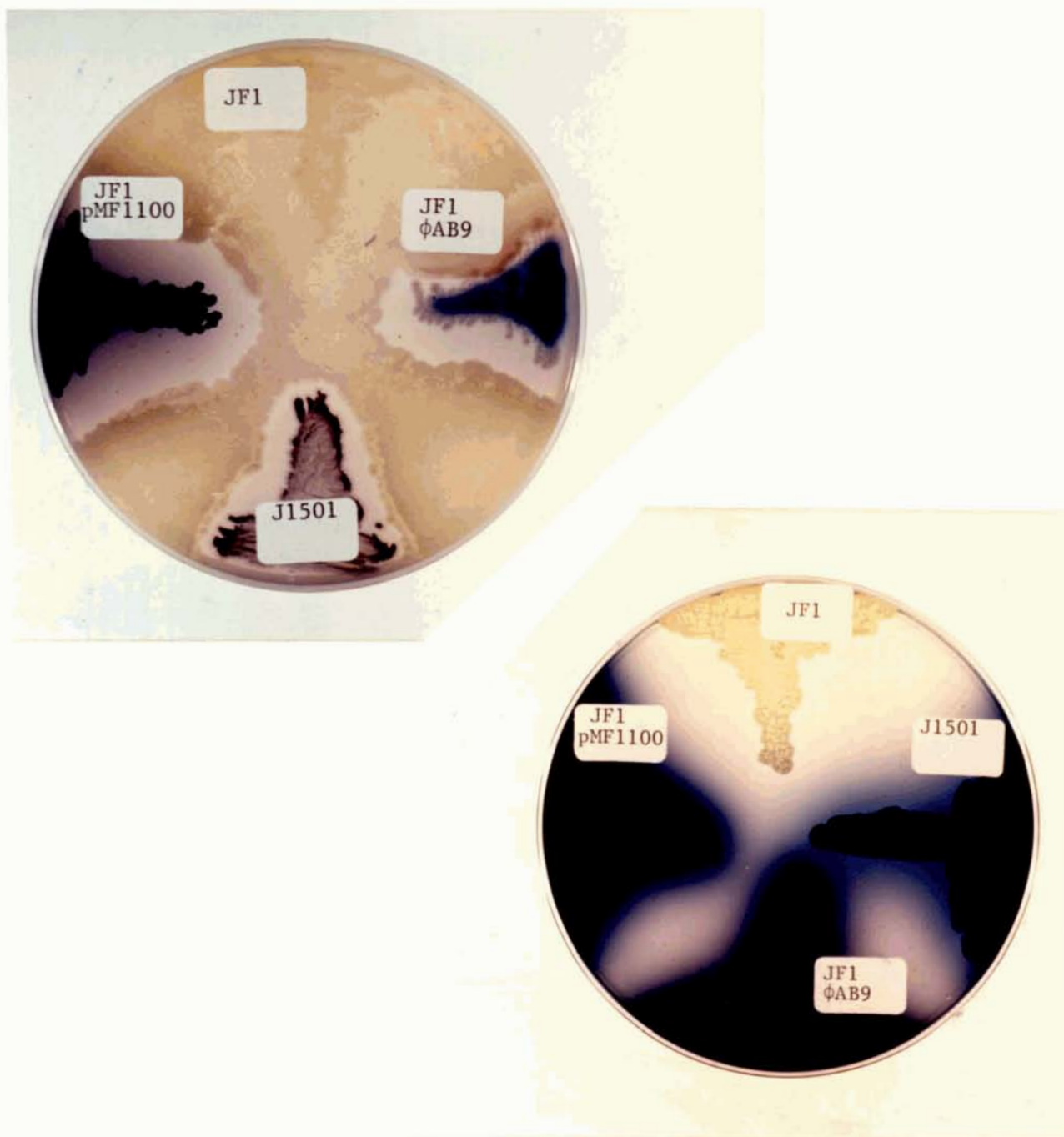
Con el fin de determinar si la actIIORF4 está implicada o no en la biosíntesis de actinorhodina, se procedió a la mutagénesis por inserción inactivante utilizando el actinofago PM1 (Malpartida y col.,1986). El fragmento elegido para insertar el fago fue el PstI(12)/BamHI(13) (fig.7, pag.15) (coords.4245-4760, fig.23, pags.62-63), generando el fago ϕ AB1. Los lisógenos obtenidos sobre la cepa *S.coelicolor* J1501, silvestre para actinorhodina, presentaban, en todos los casos, un fenotipo no productor (fig.25). Esto, sugería la implicación directa de esta ORF en la biosíntesis de actinorhodina.

Fig. 25.- Mutagénesis por inserción de la actIIORF4.



En cuanto a la secuencia de este gen, existen varios tripletes que podrían ser utilizados como sitios de inicio de traducción que se situarían entre los nucleótidos 4059 y 4149 (fig.23, pag.62) aunque ninguno de ellos posea un sitio de unión del ribosoma similar a los considerados consenso en *Streptomyces* situado a una distancia relativamente próxima (Hopwood y col.,1986a).

Fig. 27.- Ensayos de actividad biológica y de producción en placa bajo diferentes situaciones de la actIIORF4.



La actIIORF4, parece terminar en el nucleótido 4824 (fig.23, pag.63) justo en la base de la estructura "stem-loop" que actúa como

señal de parada de transcripción del gen actIII ($\Delta G = -80$ Kcal/mol) (Hallam y col., 1988) y que podría ser utilizada para el mismo fin en ambos casos.

Es importante señalar que apenas a 9 pb del primer posible inicio de traducción hacia el interior de la ORF, aparece un triplete TTA en la misma fase de lectura. Por la escasa incidencia que este codón tiene en genes de Streptomyces, 0.02%-0.04% (tabla 3, pag.8), su traducción podría suponer un cuello de botella en la expresión de este gen y, consiguientemente, de actinorhodina.

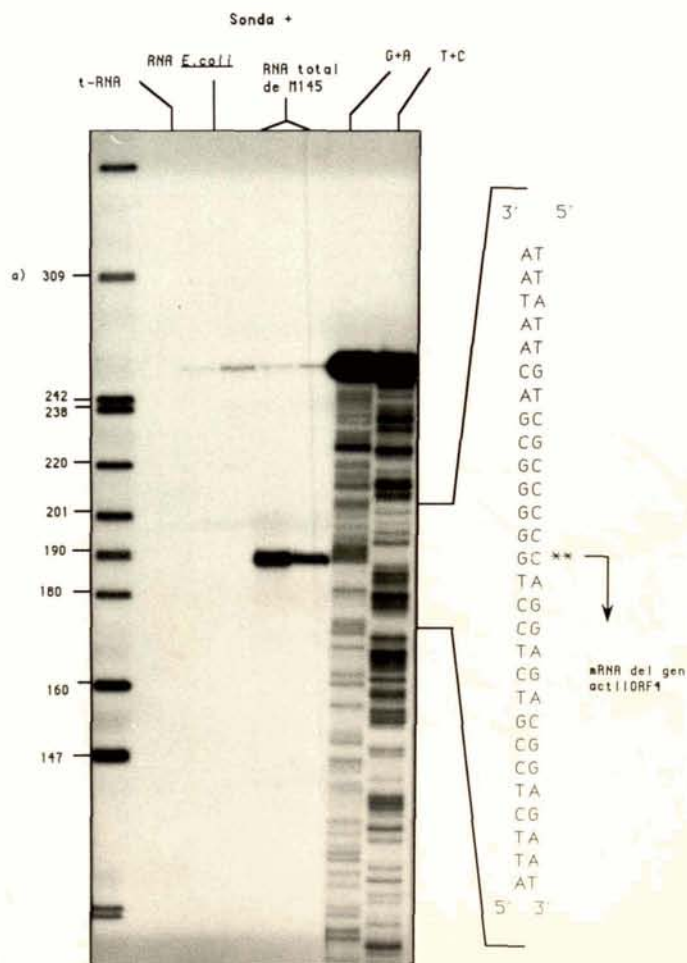
IV.2.2.- Caracterización del gen regulador del "cluster" act

IV.2.2.1.- A nivel de transcripción.

Para caracterizar de un modo preciso el mensajero que codifica el presunto gen regulador del "cluster" act, procedimos al mapeo de S1 de alta resolución en el RNA de la cepa silvestre de S.coelicolor M145.

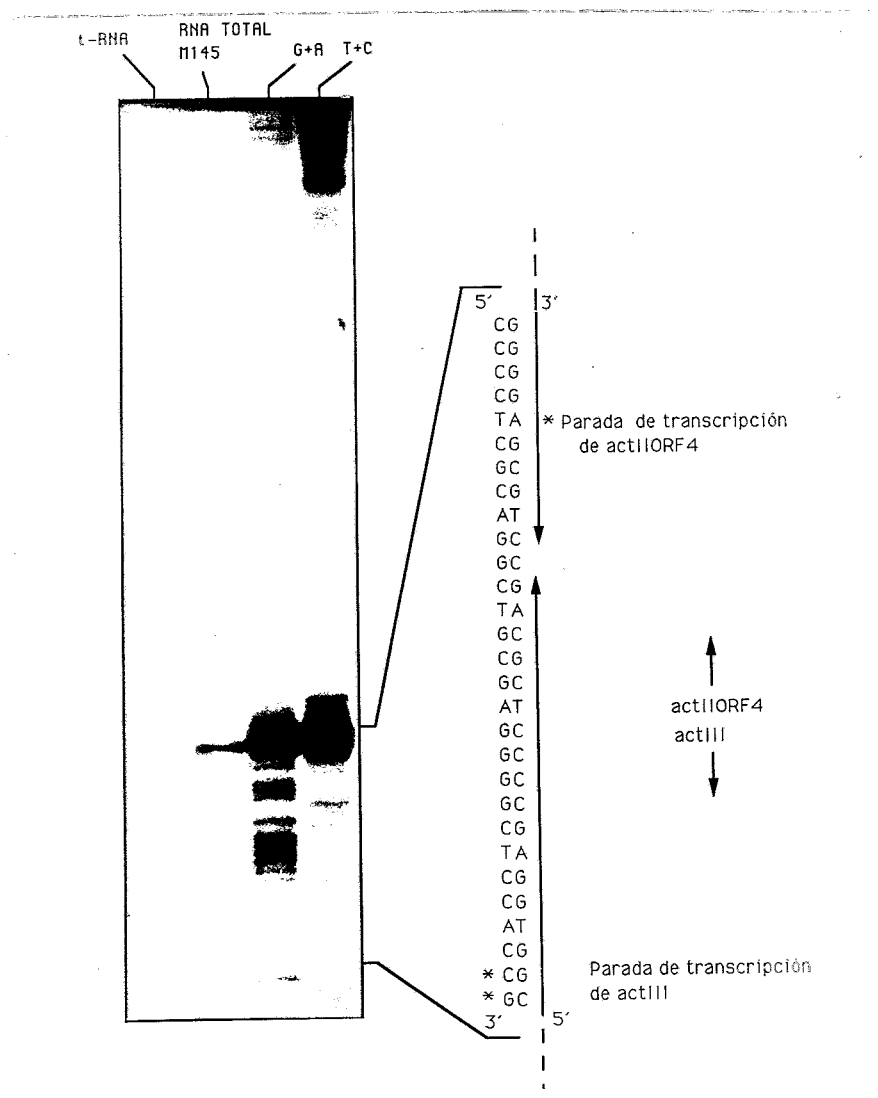
Para la identificación del extremo 5' del mensajero, utilizamos como sonda el fragmento BclI/AvaII (nucleótidos 3957-4214, fig.23, pag.62) del plásmido pMF1015, marcando previamente el extremo 5' del sitio AvaII (coord.4214, fig.23, pag.62) con T4 polinucleótido kinasa con $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (aptdo. V.15.11). La hibridación dio como resultado una única señal, localizando el inicio de transcripción de este gen, en esas condiciones, el nucleótido 4028 (figs.23, pag.62 y 28) situando la región promotora entre las coordenadas 3960-4020 (fig.23, pag.62).

Fig. 28.- Inicio de transcripción del gen actIIORF4



Para la identificación del extremo 3' del mensajero de la *actIIORF4*, utilizamos como sonda el fragmento BamHI/BglIII de 302 pb del plásmido pMF1015 (equivalente a las posiciones 4760-5057 de la fig.23 (pag.63)). La posición 5057 no aparece en dicha figura, pero no es relevante en este caso) marcado previamente en el extremo 3' del sitio BamHI con $\alpha^{32}\text{P}$ -dGTP (aptdo.V.15.11). La hibridación dio como resultado una banda única señalando el sitio de parada del transcrito en el interior de la estructura que sirve de parada para el mensajero del gen *actIII*, muy probablemente en el nucleótido 4867 (figs.23, pag.63 y 29).

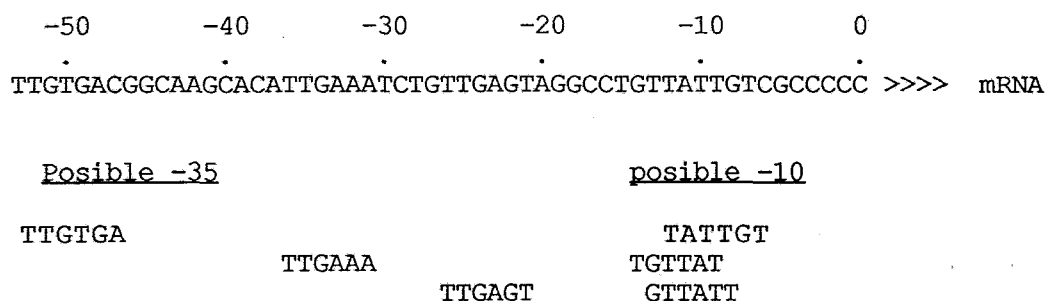
Fig. 29.- Parada de transcripción del gen *actIIORF4*



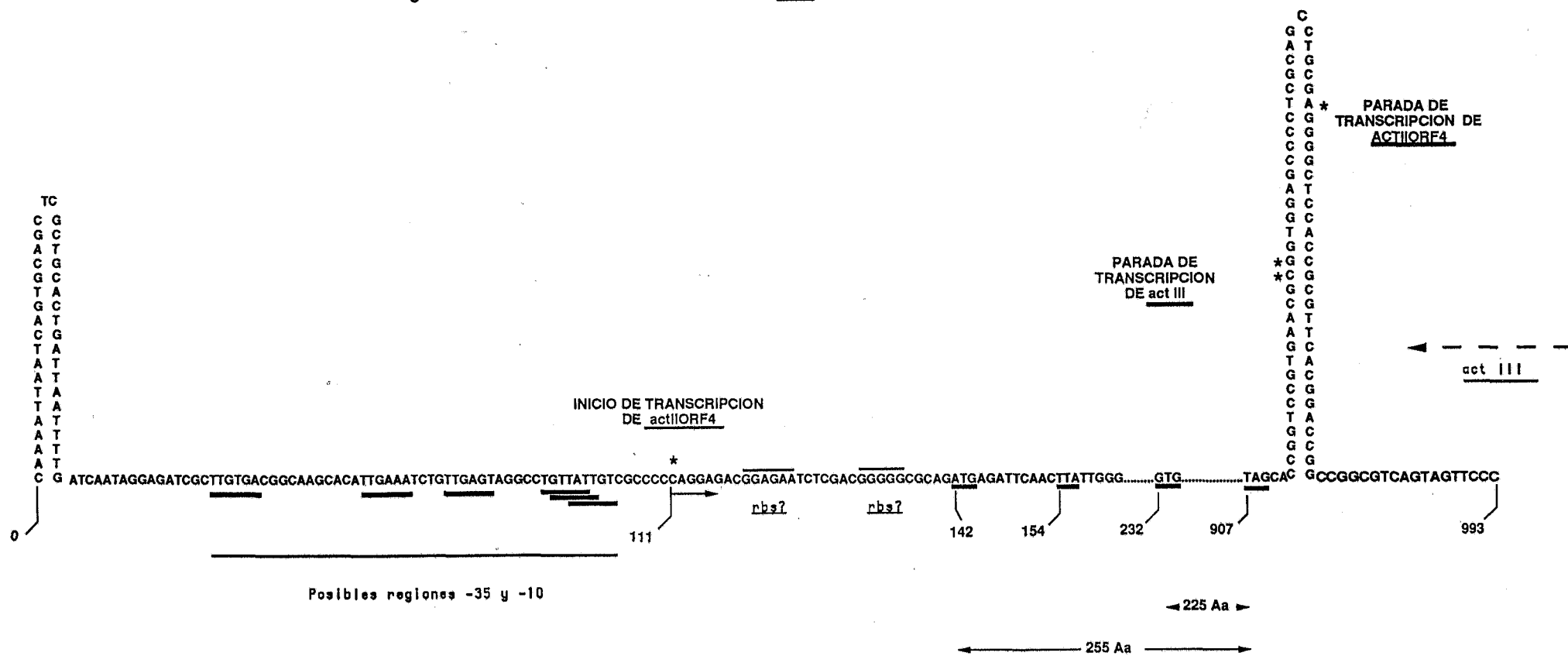
IV.2.2.2.- A nivel de promotor

La comparación de las secuencias de DNA anteriores al inicio del mensajero del gen regulador frente a otras con actividad promotora descritas en Streptomyces y otras especies, reveló la presencia de, al menos, tres regiones con distintos grados de homología a las consideradas consenso en procariotas (Hawley y McClure, 1983; Hopwood y col., 1986a). Las presuntas "TATA boxes" estarían situadas a 6, 8 y 9 pb del inicio de transcripción, (fig.30). En un intento de comprobar si dichas secuencias serían reconocidas por la RNA polimerasa de E.coli como en otros casos descritos (Buttner y Brown, 1987), procedimos a clonar el fragmento de 470 pb hasta el sitio PstI(12) (nucleótidos 3879-4245; fig.23, pag.62) en el plásmido para prueba de promotores en E.coli pGA46 (Gynheung y Friesen, 1979) y a analizar actividad tc^r . Dicho fragmento indujo resistencia a tetraciclina solamente cuando estaba presente en la misma orientación que en la actIIORF4, es decir desde el "stem-loop" rico en A-T hacia el gen, sugiriendo que la transcripción de este gen se realiza a través del reconocimiento por la RNA polimerasa mayoritaria en Streptomyces (Westpheling y col., 1985). La heterogeneidad de secuencias promotoras que presenta el género Streptomyces no nos permite saber, a priori, si podrían existir otras secuencias con dicha actividad en esta región. La comparación de esta región con promotores descritos en Streptomyces, tampoco nos sugiere nada relevante.

Fig. 30.- Región promotora del gen actIIORF4.

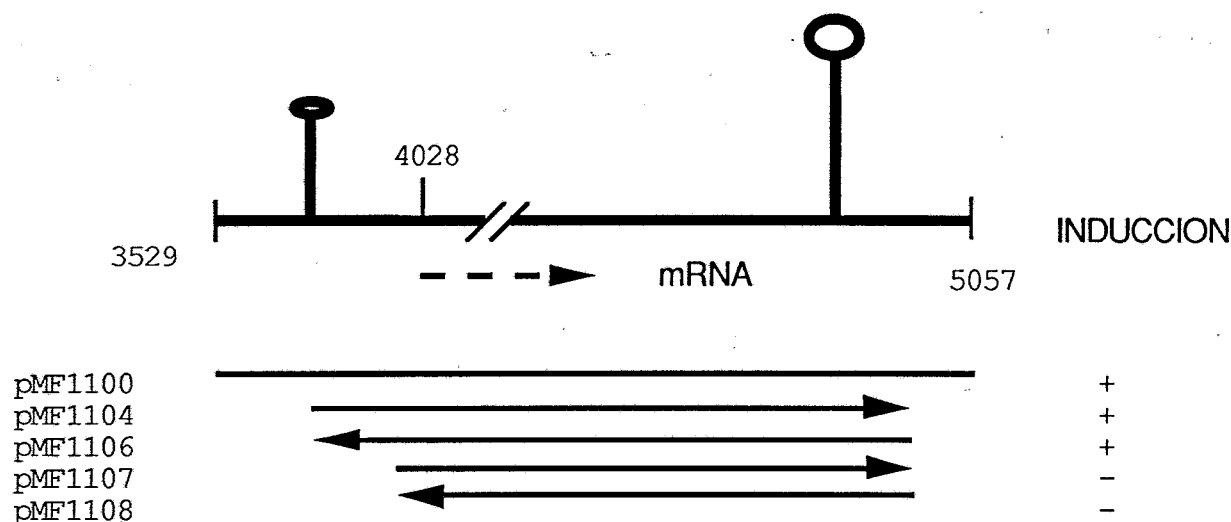


Finalmente, el gen actIIORF4 quedaría caracterizado como se muestra en la figura 31, pag.72.

Fig. 31.- GEN REGULADOR DEL CLUSTER ACT

La presencia de una secuencia tan inusual por su alto contenido en A-T pocos nucleótidos antes de la región promotora del gen regulador (fig.23, pag.62), llevó a pensar en la posibilidad de que desempeñara algún tipo de papel en el control de la expresión de dicho gen. En una primera aproximación a la cuestión, construimos los plásmidos pMF1104 y pMF1106 (tabla 6, pag.87), pudiendo comprobar que tenían el mismo efecto inductor sobre la producción de actinorhodina que el pMF1100 (tabla 6, pag.87), sugiriendo un papel no esencial de esta estructura en la expresión del gen actIIORF4 (fig.32). Como controles negativos utilizamos los plásmidos pMF1107 y pMF1108 (tabla 6, pag.87), portadores de tan solo del gen estructural sin la región promotora (fig.32).

Fig. 32.- Presunta dispensabilidad de la estructura rica en A-T sobre la expresión del gen actIIORF4.



Una de las posibles explicaciones al hecho de que S.lividans no produzca actinorhodina, o lo haga en cantidades inapreciables, poseyendo la información estructural completa, es la existencia de un mecanismo de control distinto al de S.coelicolor. En un intento de relacionar ambos fenómenos a través del control sobre el promotor del gen actIIORF4, clonamos la región comprendida entre los nucleótidos 3779-4245 (fig.23, pags. 61-62) en el plásmido para ensayo de promotores de Streptomyces pIJ4083 (Westpheling y col., 1989). Comparando dicha construcción (pMF1102) en las S.lividans, cepa TK21, y S.coelicolor, cepa JF4, bajo distintas condiciones, comprobamos que su expresión en ambas cepas era similar en distintas condiciones: este promotor era reprimido por glucosa y estimulado por fosfato.

IV.2.2.3.- A nivel de traducción.

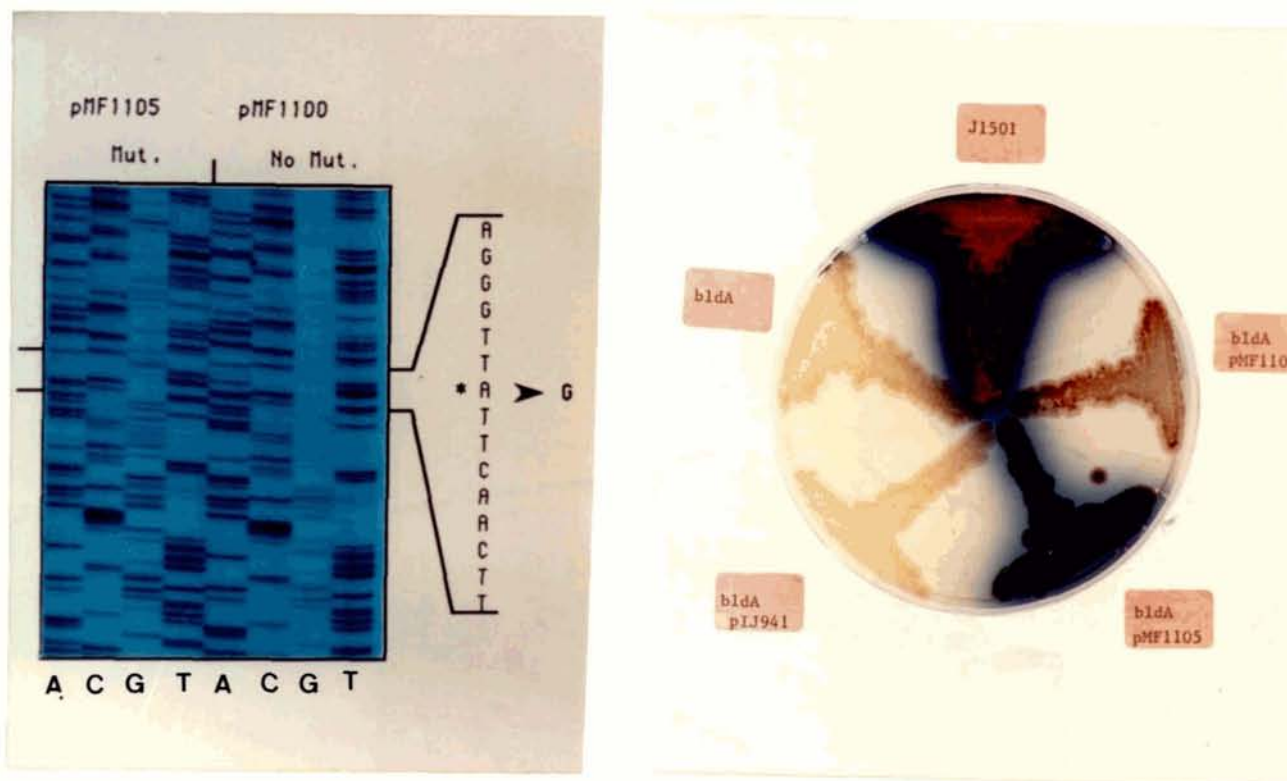
Dado que la mutación del gen bldA bloquea simultáneamente la esporulación y la biosíntesis de actinorhodina, pensamos que su producto génico (el leucin-t-RNA que lee el codón TTA) podría actuar en la ruta a nivel de su presunto gen regulador. La presencia de un codón TTA en el extremo amino terminal de la actIIORF4, parecía soportar la hipótesis de que el control de la expresión del "cluster" act podría ser realizado a nivel de traducción mediante el producto del gen bldA.

Con esta idea, procedimos a la mutagénesis dirigida sobre el único codón TTA (leucina, 0.03% de incidencia en *Streptomyces*, tabla 3, pag.8) del gen *actIIORF4*, sustituyéndolo por su equivalente TTG (leucina, 0.29% de incidencia, tabla 3, pag.8). Una vez obtenido el mutante correspondiente, construimos el plásmido pMF1105 y procedimos al análisis de complementación de la cepa J1507, mutante en el gen *bldA*.

La transformación de la cepa *S.coelicolor* (*bldA*) J1507 con el plásmido pMF1105, portador del nuevo gen *actIIORF4*, generó la recuperación del fenotipo productor manteniendo el bloqueo de la diferenciación morfológica (fig.33). Estos resultados, permitieron establecer que : (i) el inicio de traducción del gen *actIIORF4* es el ATG nucleótido 4059 (fig.23, pag.62), puesto que el codón TTA debe ser interno al gen, (ii) que el papel desempeñado por el gen *bldA* en el control de la expresión de actinorhodina es a través de la traducción del gen *actII* y (iii) que el gen de resistencia interno al "cluster", *actIIORF2*, parece, de nuevo, dispensable, puesto que la cepa J1507 transformada con el plásmido pMF1105, genera una cepa productora de actinorhodina que no traduciría su gen de resistencia al poseer éste un codón TTA interno.

Este último punto, apoya la idea de que en otro lugar del genoma debe de existir otro gen funcionalmente homólogo al *actIIORF2*, de resistencia, que podría estar expresándose a la vez, o alternativamente al situado en el "cluster".

Fig.33.- Efecto de la mutagénesis dirigida sobre el codón TTA del gen *actIIORF4*. (detalles en texto)

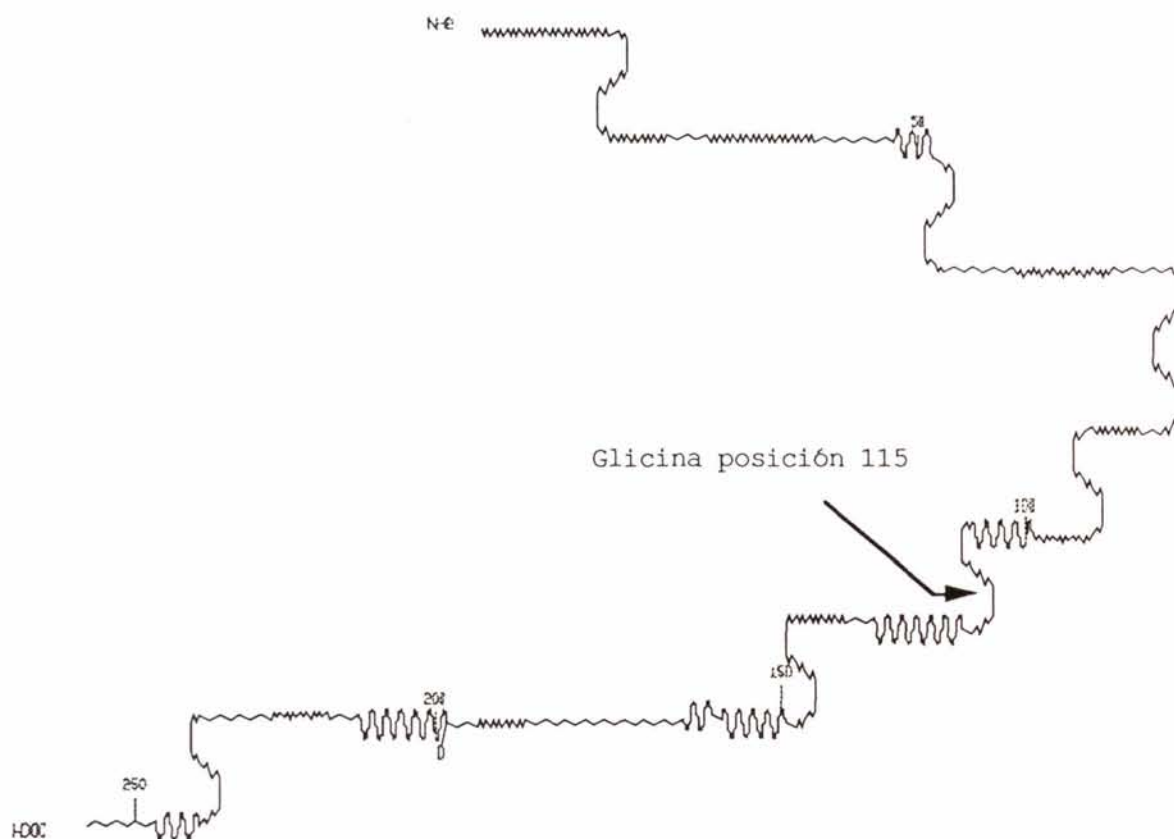


IV.2.2.4.- A nivel del producto génico actII

La comparación del producto génico del gen actIIORF4 con las bases de datos no reveló ninguna información que sugiriera una posible funcionalidad para la proteína que codifica.

El estudio de la estructura secundaria del presunto producto del gen actIIORF4, reveló la presencia de dos regiones con una posible disposición hélice-giro-hélice típica en proteínas de unión a DNA (fig.34). El alineamiento de aminoácidos con proteínas de unión a DNA reveló la conservación de varios de los aminoácidos esenciales en los contactos DNA-proteína. Estos aminoácidos conservados, pertenecen a la presunta región que presenta la estructura hélice-giro-hélice de unión a DNA (fig.35, pag.76).

Fig. 34.- Probable estructura secundaria del gen actIIORF4.



Estructura secundaria según el algoritmo de Chou-Fasman (Sequence analysis software package, University of Wisconsin)

Fig.35.- Homología del producto del gen actIIORF4 con dominios de unión a DNA.

φ80 (P4) ^a	V F L V K F I M L T G C R T A E I R L S E R S W F
fago λ ^b	- L A M E L A V V T G Q R V G D L C E M K W S D I
F:D protein ^c	K M L L A T L W N T G A R I N E A L A L T R G D F
Tn554 tnpA ^d	K L I L M L M Y E G G L R I G E V L S L R L E D I
Tn554 tnpB ^e	A T M T M I V Q E C G M R I S E L C T L K K G C L
Tn4430 tnpI ^f	Y A I A T L L A Y T G V R I S E A L S I K M N D F
actIIORF4	V A V A E R L I R T G G R L L E E N R L E E A L A

Glicina 115

a) Leong y col.,1986

b) Hoess y col.,1980, Davis,1980

c) Lane y col.,1986

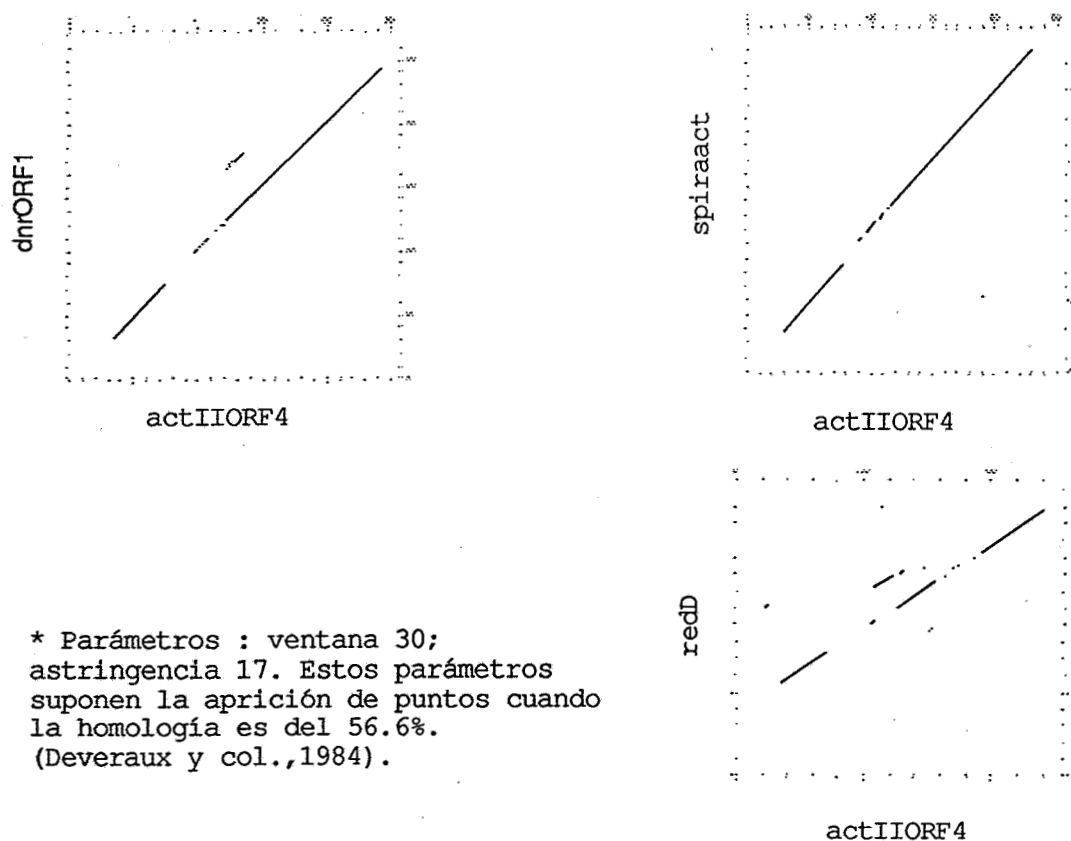
d) Murphy y col.,1985

e) Murphy y col.,1985

f) Mahillon y Iereclus,1988

Datos recientes, muestran la existencia de una importante homología entre este gen regulador de la expresión de actinorhodina y otros genes reguladores de la biosíntesis de antibióticos no presentes en las bases de datos, como daunorubicina (D.Hutchinson, comunicación personal), prodigiosina (Narva y Feitelson,1990) y spiromicina (Malpartida, comunicación personal) (fig.36), genes reguladores que, al menos en los dos primeros casos, parecen internos a sus respectivos "clusters". Esta homología sugiere posibles mecanismos de regulación comunes.

Fig. 36.- Comparación a nivel de aa de varios genes reguladores de la expresión de antibióticos.*



IV.3.- CARACTERIZACION DE SECUENCIAS DE ACTIVACION PLEIOTROPICAS.

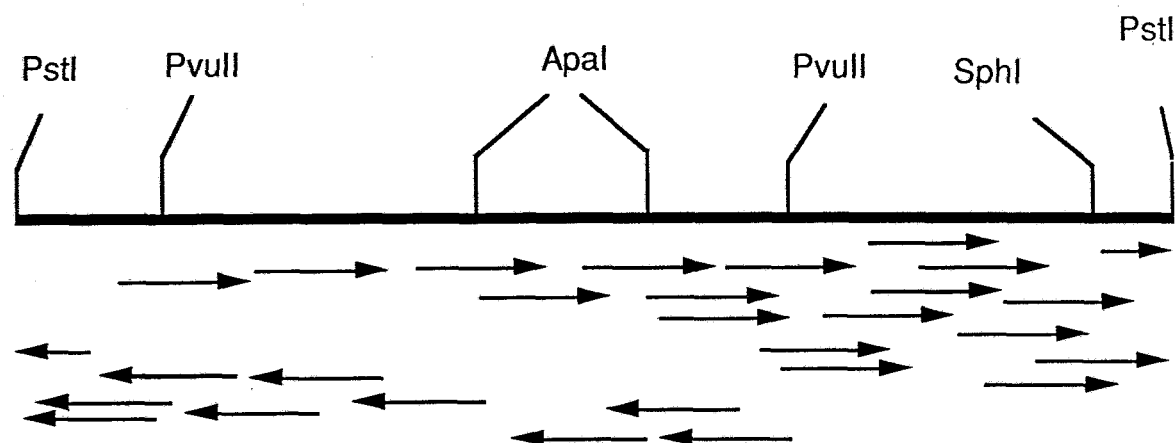
La aparición de una colonia de S.lividans productora de actinorhodina durante la construcción de una genoteca de S.coelicolor sobre el plásmido pIJ486, llevó al aislamiento de un fragmento de DNA de 20 kb responsable de la inducción del sistema act en S.lividans. Este fragmento no estaba físicamente ligado al "cluster" act (Malpartida comunicación personal). Posteriores subclonajes, dejaron la región de 20 kb reducida a un fragmento BglII de 4.3 kb que fue denominado smas (secondary metabolism activator sequences).

En el laboratorio, pudimos comprobar mediante Southern que se trataba de una región del genoma de S.coelicolor cuya secuencia parecía ampliamente conservada en distintas especies del género Streptomyces. Estos análisis, además, confirmaron que estas secuencias no presentaban homología a nivel de Southern con otras descritas en otros laboratorios (afsB, Horinouchi y col., 1983) como activadores del metabolismo secundario.

Con el fin de caracterizar las secuencias responsables de la activación, se subclonaron distintas regiones del fragmento original (pIJ2343, Malpartida, comunicación personal), llegando finalmente a localizar en un fragmento PstI de 2.7 kb las secuencias responsables de la activación, procediendo a secuenciarlas.

La estrategia de secuenciación de este fragmento PstI inductor de actinorhodina en S.lividans, se muestra en la figura 37 y la secuencia de nucleótidos en la figura 38 (pags.78-81).

Fig. 37.- Estrategia de secuenciación de la región smas.



En aquellos puntos en los que sólo se leyó una cadena, se hizo con al menos dos clones, varias veces y tanto con "sequenase" como con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa.

Un primer análisis de la secuencia basado en el uso de codones (fig.39, pag.81), reveló la presencia de dos posibles ORF's a la izquierda, otras dos ORF's centrales, de transcripción divergente a las anteriores, que denominamos smasORF1 y smasORF2, y el inicio de otra, al final del fragmento (smasORF3), que parece transcribirse en la misma dirección que las centrales.

Un análisis más preciso de la secuencia (fig.38, pags.78-81), reveló dos posibles inicios de traducción en la smasORF1 : un GTG en la posición 962 y un GTG en la posición 1055. En ambos casos, iban precedidos de un potencial sitio de unión al ribosoma de acuerdo con otros descritos para genes de *Streptomyces* (Hopwood y col.,1986a), posiciones 951-957 y 1037-1042. La smasORF1 terminaría en un TGA (nucleótido 1538).

Tras una región no codificante de 133 pb, comenzaría la smasORF2 con un GTG (nucleótido 1671) y, aparentemente, sin un sitio de unión del ribosoma similar a otros descritos (Hopwood y col.,1986a). Esta ORF terminaría en un TGA (nucleótido 2112).

La smasORF3, comenzaría con un ATG (nucleótido 2773) e iría precedido de un sitio de unión al ribosoma de acuerdo con los consenso.

Fig. 38.- Secuencia de nucleótidos de la región smas de acción pleiotrópica sobre el "cluster" act.

<u>PstI</u>	
1	CTGCAGCAGACCGGGGACGTACTGGATCTCGAAGGTACGGATGGTCGCCGCGGCCTCCTA 60
61	AGGCCGACCAGGCGGTCTGAACCACTCGGGCATCAGGCGCTTGTCGTACCGCTGCCACCAG 120
121	CCCGGTTTCGCCCCGCTCGTTGCAACAGCTTGAGCAGGACCGAGGCCTCGTACGGATCGGTG 180
181	TCGTAGTGCTCCAGCAGCGCCCGGACGTCGGTCTCCGAGGGAGCCTGCGGCCCTTGCCCG 240
241	ACTCGATGCGCGAGAGCTTCGCGGCGCTGAAGCCGAGCGCGGTGCGGCCTGGTCCTGGG 300
<u>PvuII</u>	
301	AGAGGCCGGCATCCTCGCGGAAGCCCGCCAGCTGCACGCCGACGAGCATCTTCAGCAGGG 360
361	TCGGAGCCGGCTCGGCCCCGATCCAGATAGGGTTCGAGACGGGAGATGCGATGCGACGCGG 420
421	CGGACATCCTGACTCCCAGCAGACCGGCAGACTTGAAGGAAAGACTATCTCATCCCCTCG 480
481	GTGCCCCGCCGATCCGCCCCGGAAATCGGGTAGTTGGGCTCCGCTTCCGGGGGCCGCCG 540
541	CGCCGCCCGCGCCCTACACCAGGTGGTCTGAAGTCTCGCCGTCTTCGCACCCGCCAGGAACG 600

601 CCGCCACCTCGGCCGGGGTGTAGACGAGCGCGGGGCCGTGCGGGTCCCGGGAGTTGCGCA 660

661 TCGCGATGCCTCCGTCGACGAGGGCGACCTCGACGCAGTTGCCCTCGGCGTTGCTGTGCC 720

721 GACTCTTCTTCCAGCAGGCGTCCAACAAGCTGGCCTGCACTCCGTTGCGCACTGGTGGCA 780

781 CCGCGGTCTCCTTGCTGTTTCGGGGGAGCGGACCGAGTCGTACCGGTCCCCGAGCGCCCC 840

841 ATCCGACTTTTTTCGCGCAATTTCTCGTGCAATTGCACGCGAGCGCTCTAAGCGTGGATA 900

901 ATAGCCGTGGCGTCAACCCCCCGGTGACGCCCCGTTCTGACGTGCGATCAGGGAGATGC 960

961 TGTGCCGTACCTGCGCATCCAACGCTCCGGTGC GCCGGCGAACCCGGGTGCGAGGCAGG 1020

V P S P A H P T L R S P G E P G S E A G

1021 CGAGGCGACCCGCTCCGGAGGACTCCCGTACCCGGTGC GGCGCCACCGCCGGCCGGGCCGT 1080

E A T R S G G L P Y P V R A T A G R A V

1081 CCCGCCGTGCTCCGCCCGGTACCCGGGCAGCCCCGCTCTCGGCGGCCGCCCGACCGCCGC 1140

P P S S A P Y P G S P A L G G R P T A A

1141 CGTACTGCGCGTCGCGTGACGCGGGGAGGGGTTCGCCCCGGGCCCGGGTCTTCACGCGGGA 1200

V L R V A C S G E G F A R A R V F T R D

1201 CACCCTGCGCGGGTGGTTCGCTCGACCACCTCGGCGACGACGCGGTCTCTGATCACC GA 1260

T L R G W S L D H L G D D A V L V I T E

1261 ACTCGTCTCCAACGCGCTGACGCACGCGGTGCCGCCGTGCGTGGCCGGCGGGCCGGAGAT 1320

L V S N A L T H A V P P S V A G G P E I

1321 CGGGCTCGGACTCGCCCTGGGCTCCGGCCGGCTGAAGCTGACCGTCTCCGATCCCGGGGA 1380

G L G L A L G S G R L K L T V S D P G D

1381 CGACGCGCCCCGGCTCAACCCGTCCGACGGCTCCGCACTCCGGGAGCACGGACGCGGCC T 1440

D A P R L N P S D G S A L R E H G R G L

1441 GTGCATCGTCGACGCCCTCGCCGAGGAGTGGGGCTGGACCCCGCGCCCGCCGGCGGGCAA 1500

C I V D A L A E E W G W T P R P P A G K

1501 GACGGTCTGGGCCACGTTGTGACCCGCCCCCTCACCTGACCCGACTGCCGCGGAAGGGC 1560

T V W A T L S T R P L T *

1561 CCCACACCATGCGCAGCGCTCCGACACCCGAGCCGAGCATCCGGCGCACCGACCGTCA GA 1620

. SphI .

2581 CACCGCCCTGCGGTCCGCGCTGTGCACGCGCATGCAGCAGCTCTCCATCGGCTACCACTC 2640
T A L R S A L C T R M Q Q L S I G Y H S

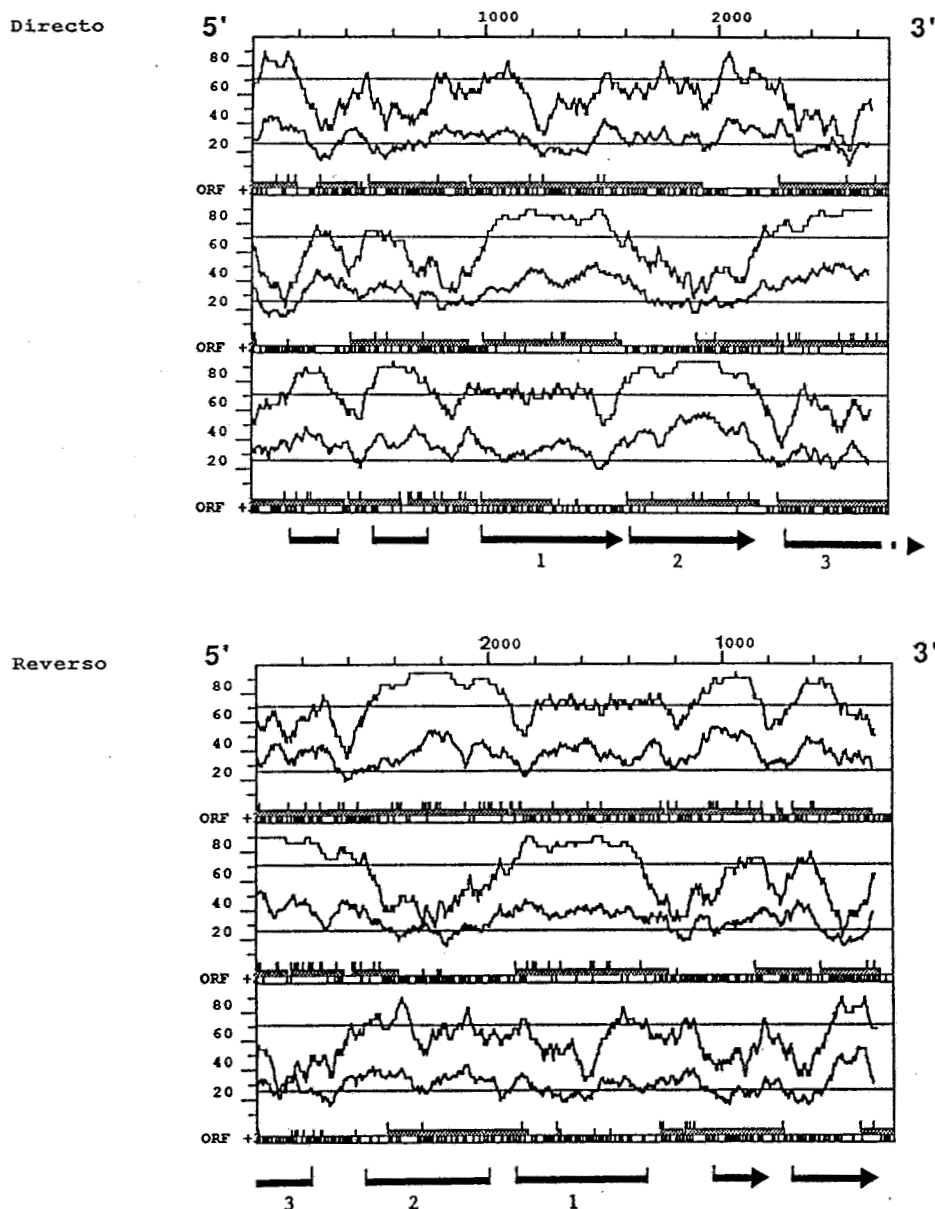
2641 GCGGGTCAGCGCGGGCGTGCTGCAG 2665
R V S A G V L Q

----- Presunto inicio de transcripción del
mRNA policistrónico que codifica las
smasORF1 y 2

Aparecen subrayados los posibles inicios de traducción
y los sitios de unión al ribosoma.

>> dirección de transcripción.

Fig. 39.- Análisis de fases de lectura de la región smas.

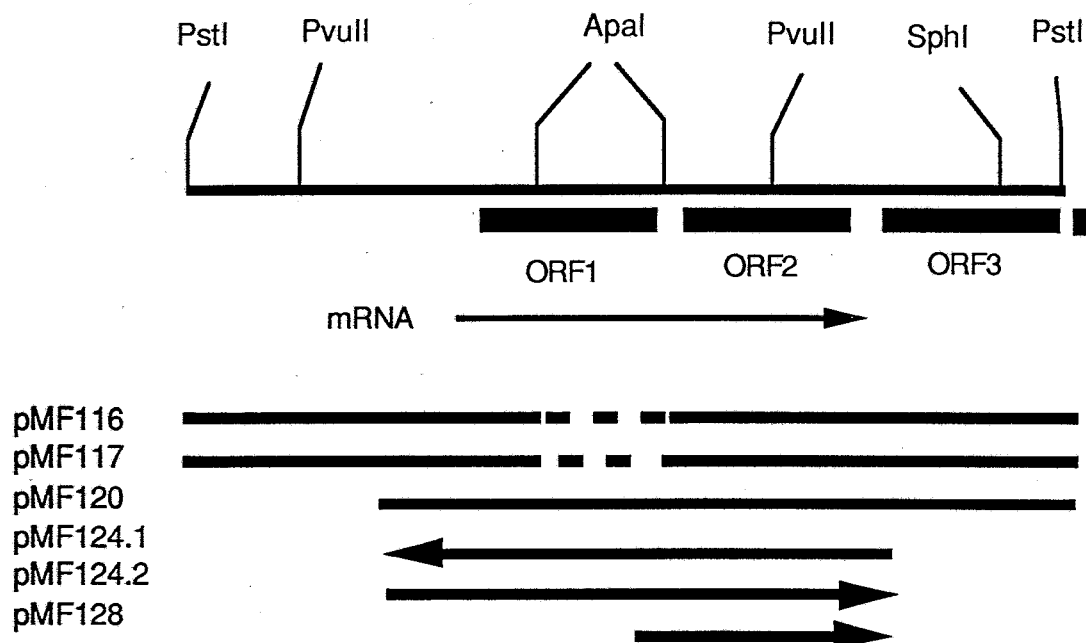


IV.3.1.- Funcionalidad de las secuencias smas.

Para averiguar si el mecanismo de activación del "cluster" act por acción de las secuencias smas pudiera ser alternativo al utilizado por el gen regulador endógeno, actIIORF4, procedimos al análisis de complementación de una serie de mutantes de la clase actII (S.coelicolor JF1, B43, B44 y B58), con el plásmido pIJ2343. Ningún mutante presentó fenotipo productor al ser transformado, por lo que el mecanismo de activación del "cluster" act por las secuencias smas, no era simplemente por un incremento en la dosis génica, como ocurría en el caso de actIIORF4.

Seguidamente, basándonos en los datos de secuencia, procedimos a tratar de identificar la ORF/ORF's implicada/s en la regulación de la expresión del sistema act de entre las cuatro posibles. Para ello, la región inductora de la producción de actinorhodina en S.Lividans fue acotada en un primer paso entre las posiciones 620-2665 (fig.38, pags78-81), plásmido pMF120, y posteriormente entre las posiciones 620-2250, plásmidos pMF124.1 y 124.2 (tabla 6, pag.87) (fig.40). Estas construcciones sugerían como presuntas responsables directas de la inducción, a las ORF's smasORF1 y smasORF2.

Fig. 40.- Subclonaje parcial de la región smas



El que los plásmidos pMF116 y pMF117 (tabla 6, pag.87) (fig.40) no afectaran a la producción del antibiótico sugería la necesidad del producto génico de la smasORF1 para la inducción de la expresión del "cluster", aunque este dato parece ser contradictorio con el hecho de que el plásmido pMF128 (tabla 6, pag.87) (fig.40), portador de la smasORF2 aislada, sí lo hiciera. Los únicos tres clones positivos obtenidos de esta ORF, tenían el fragmento orientado en sentido contrario a la señal de terminación de la transcripción del vector pIJ486 (pMF128, coords. 1519/2250, fig.38, pags.79-81). La retransformación de S.lividans con el plásmido pMF128 generaba una

gran heterogeneidad de colonias, tanto a nivel morfológico como de producción de actinorhodina, sugiriendo la pérdida de los mecanismos de control de la expresión de esta región. Esto, señalaba como responsable de la activación del "cluster" *act* en *S. lividans* a la *smasORF2* y hacia la ausencia de actividad promotora o sistemas de control para su expresión entre esas coordenadas.

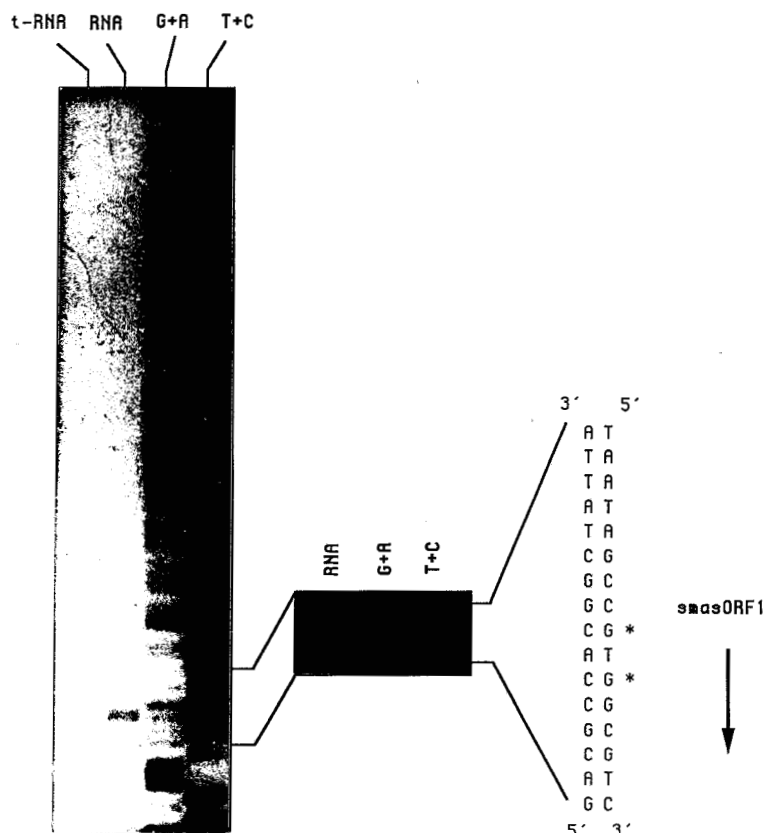
IV.3.2.- Caracterización de la región *smas*.

IV.3.2.1.- A nivel de transcripción.

En un intento de caracterizar a nivel de transcripción el sistema *smas*, procedimos a su mapeo de S1 de alta resolución

Para la identificación del inicio de transcripción de la *smasORF1* utilizamos como sonda el fragmento BglII/NotI del plásmido pMF108.3 (equivalente a las posiciones 620/1122, fig.38, pags.79-81) marcado en el extremo 5' del sitio NotI con $\gamma^{32}\text{P}$ dATP y polinucleótido Kinasa. El RNA utilizado en la hibridación procedía de un cultivo crecido en medio SY hasta alcanzar una coloración azul muy intensa. El resultado de la hibridación, nos señaló un inicio de transcripción mayoritario en el nucleótido 909 y otro, menos utilizado pero destacable, en el 907 (figs.38,41).

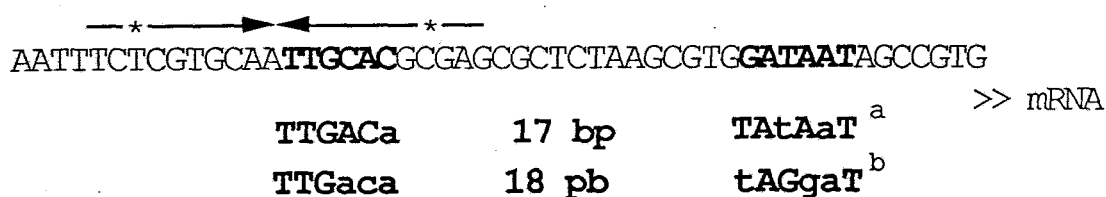
Fig. 41.- Inicio de transcripción de la *smasORF1*.



Los experimentos de mapeo de S1 de alta resolución para tratar de identificar el posible inicio de transcripción del gen smasORF2 se llevaron a cabo utilizando como sonda el fragmento de 251 pb NaeI/XmaI del plásmido PMF108.4 (equivalente a las posiciones 1489/1741, fig.38, pags.79-81) marcado en el extremo 5' del sitio XmaI con $\gamma^{32}\text{P}$ dATP. El resultado de la hibridación con el mismo RNA utilizado en el experimento anterior reveló que toda la sonda era protegida por el RNA, sugiriendo un mRNA policistrónico para ambos genes.

El mRNA policistrónico que codifica las secuencias smas, estaría controlado, al menos, por un posible promotor muy similar a los descritos como consenso en procariotas (Hawley y McClure, 1983) y a otros descritos en Streptomyces (Hopwood y col., 1986a) (fig.42), aunque la heterogeneidad de secuencias promotoras en Streptomyces no nos permita descartar otras posibilidades. La presencia en la presunta región -35 de una secuencia que podría formar una estructura similar a la presentada por algunos operadores bacterianos (Klock y col., 1985) (fig.42), podría sugerir la existencia de otras señales implicadas en el control de la expresión de este gen, abriendo la posibilidad de la existencia de un nuevo escalón en la presunta cascada de señales reguladoras que conduce a la producción de metabolitos secundarios en Streptomyces.

Fig.42.- Posible región promotora de las secuencias smas.



a) secuencias consenso para procariotas (Hawley y McClure, 1983)

b) secuencias consenso para promotores de Streptomyces reconocidos por la RNA polimerasa mayoritaria. (Hopwood y col., 1986a)

IV.3.2.2.- A nivel funcional.

Para tratar de aclarar qué ORF estaba implicada realmente en la inducción del sistema, procedimos a la disrupción génica por inserción, en la cepa S.coelicolor J1501, del fago PM1 (Malpartida y Hopwood, 1986) portando un fragmento interno a los presuntos productos génicos. Este experimento, estaba especialmente dificultado por el pequeño tamaño de las ORF's (579 pb la smasORF1 y 444 pb para la smasORF2) que genera problemas en la lisogenia. Los fragmentos utilizados en la mutagénesis fueron el BglII/HincII del plásmido PMF108.4 (equivalente a las posiciones 1055/1448, fig.38, pags.79-81) para la primera ORF y el SacII/DdeI del plásmido PMF108.5

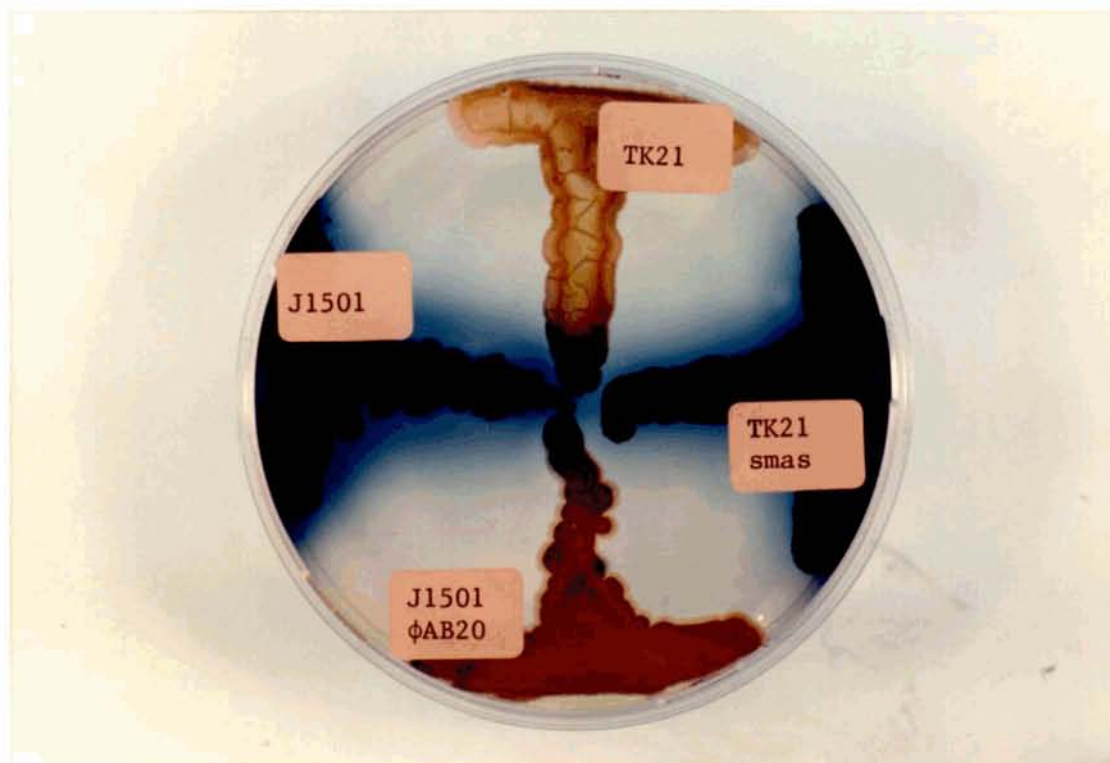
(equivalentes a las posiciones 1636/2111). En ambos casos utilizamos el fago PM1 (Malpartida y col.,1986).

Solamente encontramos un lisógeno estable y morfológicamente normal para la *smasORF1*, pero al analizarlo mediante Southern encontramos que, a pesar de portar aparentemente el fragmento deseado, la inserción en el cromosoma se había realizado a través de la secuencia de inserción IS110 (Bruton y Chater,1987) respondiendo a un fenómeno que ocurre con cierta frecuencia en la manipulación de derivados *att⁻* del fago ϕ C31 (Chater y col.,1985b). El fenotipo de este lisógeno era, lógicamente, salvaje para actinorhodina.

Del intento de disrupción génica del gen *smasORF2* obtuvimos una población de aproximadamente un 50% de lisógenos productores y no productores. El análisis de representantes de ambas poblaciones mediante Southern, reveló que la recombinación se había realizado a través de la IS110 en los lisógenos productores y a través del fragmento interno a la *smasORF2* en los no productores.

El análisis del fenotipo de los lisógenos no productores en la *smasORF2*, reveló que la inserción inactivante, además de bloquear la biosíntesis de actinorhodina, generaba la pérdida de la capacidad de producir prodigiosina y CDA, sin tener datos aún sobre la producción de metilenomicina (fig.43).

Fig. 43.- Papel de la región *smas* en la producción de actinorhodina y prodigiosina en *S.coelicolor*.



De los resultados anteriores, podemos deducir que, al menos, la *smasORF2* parece estar directamente implicada en la regulación de 3 metabolitos secundarios en *S.coelicolor*. Esto, sitúa a este sistema génico en un paso anterior al representado por los genes *actIIORF4* o

de antibióticos. Aunque aún no hay datos para aventurar una hipótesis sobre el mecanismo de activación, la función del sistema génico representado en el smas parece ser clave en la encrucijada hacia el metabolismo secundario.

La mutagénesis por inserción de la smasORF3, se realizó tratando de buscar un efecto fenotípico que pudiera, en el caso de su identificación, conducirnos a la localización en el cromosoma de S.coelicolor de la región objeto de este estudio. El fragmento utilizado fue el BglII de 364 pb del plásmido pMF108.11, equivalente a las posiciones 2300/2665 (fig.38, pags.79-81. Los lisógenos obtenidos eran productores y no revelaron auxotrofía alguna.

Tabla 6.- Tabla de clones contruidos para este trabajo

Streptomyces

<u>Plásmido</u>	<u>vector parental</u>	<u>Coords.</u>	<u>fig.</u>
pMF116	pIJ941	1-2665 (Δ1179-1562)	38
pMF117	pIJ486	"	38
pMF128	pIJ487	1519-2251	38
pMF120	"	620-2665	38
pMF124.1	"	620-2251	38, 40
pMF124.2	"	620-2251	38, 40
pMF1100	pIJ941	3529-5057#	23, 32
pMF1104	"	3959-4943	23, 32
pMF1105*	"	3529-5057#	23, 32
pMF1106	"	3959-4943	23, 32
pMF1107	"	3959-4943 (Δ3967-4023)	23, 32
pMF1108	"	3959-4943 (Δ3967-4023)	23, 32

* Este plásmido es como pMF1013 pero con el codón TTA (coord.4071, fig.23) mutagenizado a TTG.

La coordenada 5057 (SalI) no aparece en la figura 23, pero no es relevante, salvo como medio de clonación, al ser interna al gen actIII

<u>Fago</u>	<u>características</u>	<u>fig.</u>	<u>fago parental</u>
φAB1	fragmento 517pb coords. PstI (12) / BamHI (13), coords. 4245/4760	7, 23	PM1
φAB2	coords. PvuII (1582) BamHI (13), (4760).	23 7, 23	PM1
φAB3	coords. (PstI, 1019/XhoI, 1945)	23	KC516
φAB9	coords. 3529/ 5057#	23	PM1
φAB10	φAB9, inserto en orientación invertida		PM1
φAB20	fragmento 392 pb. Coords. 1719-2111	38	PM1

La coordenada 5057 (SalI) no aparece en la figura 23, pero no es relevante, salvo como medio de clonación, al ser interna al gen actIII

E.coli

<u>Plásmido</u>	<u>vector parental</u>	<u>Coordenadas</u>	<u>fig.</u>
PMF108.3	pIJ2921	620-2665	38
PMF108.4	"	1055-2665	38
PMF108.5	"	1636-2665	38
PMF108.11	"	2301-2665	38
PMF118 "	"	1719-2111	38
PMF119.2	"	620-2251	38
PMF1013	"	3529-5057#	23
PMF1015	"	3779-5057#	23
PMF1052*	"	3529-5057#	23

* Este plásmido es como pMF1013 pero con el codón TTA (coord.543, fig.24) mutagenizado en TTG

La coordenada 5057 (SalI) no aparece en la figura 23, pero no es relevante, salvo como medio de clonación, al ser interna al gen actIII

V.- DISCUSION

V.1.- REGION DE EXPRESION TEMPRANA Y MEDIA.

El estudio de la secuencia de la región de expresión temprana y media del "cluster" act, ha puesto de manifiesto la presencia de 9 ORF's completas y una incompleta (que podría estar situada fuera de los límites del "cluster"), así como su probable organización transcripcional y las funciones de algunos de los productos génicos codificados por esta región.

Datos anteriores y evidencias aportadas por este trabajo, parecen demostrar que las 6 primeras ORF's están codificadas por un mismo mensajero policistrónico, y que sus productos génicos están implicados en las primeras etapas de la ruta. La transcripción de este mensajero estaría, probablemente, relacionada de un modo estrecho con la transcripción, divergente, del gen actIII. Dicha relación, se podría establecer a través de la acción de señales de control comunes sobre sus respectivos promotores (fig.19, pag.52).

Por su parte, las actORF's 7 y 8 podrían situarse sobre un mismo mensajero, de expresión intermedia y convergente al anterior, cuya región promotora estaría estrechamente relacionada con la del mensajero codificante de la actORF9, de transcripción divergente a su vez.

Esta disposición de fases de lectura y transcritos probables (fig.19, pag.52), supondría la presencia de tan solo cuatro mensajeros con dos regiones intercistrónicas. La posible existencia de señales de regulación comunes para promotores divergentes, colocaría los presuntos 10 genes de esta región bajo el control de dos señales de este tipo (o tan sólo una, si son similares y es el mismo tipo de promotor). Esto, implicaría la necesidad de un reducido número de señales y, por tanto su fácil centralización en pocos genes, para controlar la expresión de los genes implicados en las primeras etapas de la ruta biosintética de actinorhodina.

Tras el establecimiento de la probable organización física de la región derecha del "cluster" act, realizamos una serie de estudios comparativos con los presuntos productos génicos de las ORF's de acción temprana mencionadas. Estos estudios, revelaron que las tres primeras ORF's poseían una alta homología con subunidades (en el caso de complejos multienzimáticos) o regiones (en el caso de proteínas multifuncionales) encargadas de la biosíntesis de ácidos grasos en distintos sistemas, sugiriendo un mecanismo de catálisis similar.

La sintetasa de actinorhodina parece ser, pues, el resultado de la interacción de varios productos de genes físicamente independientes, lo que, unido a la elevada homología estructural y funcional con las sintetetas de ácidos grasos, la asociaría, a nivel organizativo, con una FAS de tipo II, característica de procariotas (McCarthy y Hardie, 1984; Wakil, 1986).

El aparente acoplamiento traduccional, observado previamente en muchos operones bacterianos (Zalkin y Ebbole, 1988), que presentan algunas de las ORF's del policistrón de acción temprana del "cluster" act, supondría la obtención equimolar de los productos génicos acoplados, ORF's 1/2 y 3/4/5 (si asumimos que no existen diferencias en los niveles de traducción). Esta disposición, podría estar

implicada de una manera esencial en la programación del ensamblaje de las distintas subunidades para lograr una correcta estructura final del complejo "sintetasa de actinorhodina".

Los datos sobre homología y el presunto acoplamiento traduccional de las actIORF1 y actIORF2 parece sugerir que, muy posiblemente, estas ORF's están implicadas en la formación de un heterodímero, responsable de la condensación de los residuos de malonilCoA durante la elongación de la cadena de poli-cetos.

La ausencia en el producto génico de la actIORF2 de un residuo cisteína que pudiera ejercer como sitio de anclaje de las unidades a condensar, elimina virtualmente la posibilidad de que esta proteína pueda constituir una segunda enzima condensante, como ocurre en *E. coli* (Jackowski y Rock, 1987). Si la función de esta enzima está, como parece, directamente implicada en la condensación de residuos de malonilCoA, pero no puede interactuar con ellos directamente, quizás su función esté relacionada con el mantenimiento de la estructura necesaria para la correcta interacción entre la enzima condensante, actIORF1, y el resto de las subunidades del complejo, generando el entorno tridimensional adecuado que permite la interacción de los residuos a condensar con la cisteína del centro activo de la actIORF1. El descubrimiento de nuevos sistemas similares, sintetetasas de poliquétidos y de sintetetasas de ácidos grasos, y la profundización en los que ya conocemos, nos permitirán, en un futuro, identificar el papel de la actIORF2 y sus equivalentes en los sistemas descritos (granaticina, Sherman y col., 1989; tetracenomicina, Bibb y col., 1989; whiE, Chater, comunicación personal), en el programa de la biosíntesis de la cadena del poli-ceto.

En el análisis de los datos obtenidos a lo largo del mensajero policistrónico de acción temprana, identificamos a continuación una ORF, actIORF3, que codificaba una pequeña proteína de aproximadamente 9 kD. La asociación del producto de esta ORF con una proteína transportadora de acilos, proteína presente en todos los sistemas de síntesis de ácidos grasos conocidos con una sola excepción (Schüz y col., 1983), aporta nuevas evidencias sobre la semejanza entre las primeras etapas de la biosíntesis de poliquétidos en *Streptomyces* y la síntesis de ácidos grasos. La función asignada a la presunta ACP del sistema sintetasa de actinorhodina, es la de ligar los unidades básicas de la elongación (mediante el brazo de fosfopanteteína anclado en el residuo serina de su centro activo) y presentarlos, para su condensación, a la actIORF1, presunta enzima condensante.

La presencia casi universal de ACP's en las sintetetasas de los poliquétidos descritos, sugiere la incapacidad de estos sistemas, a pesar de su semejanza, para utilizar las proteínas transportadoras de acilos del metabolismo primario (de la ácido graso sintetasa), a la vez que permite especular con la existencia de una posible relación evolutiva. Estas sugerencias, vienen apoyadas por la sensiblemente mayor homología que presentan las ACP's de sintetetasas de poliquétidos entre sí que con las sintetetasas de ácidos grasos, y viceversa. Así, la ACP de la sintetasa de ácidos grasos de *E. coli* será más homóloga a su

equivalente en las espinacas que a la ACP de la sintetasa de actinorhodina o granaticina, muy semejantes entre sí.

Continuando en esta línea de trabajo, los estudios realizados sobre la actORF4 no han permitido identificar claramente la función de su producto génico, aunque datos indirectos de complementación nos llevan a pensar que forma parte del complejo actinorhodina sintetasa. Su

aparente acoplamiento traduccional con la ACP y la complementación de mutantes de la clase actVII (mutación asociada a la ausencia de ciclación en la cadena carbonada que se considera función de la sintetasa) nos lleva a sugerir la posibilidad de que la actORF4 esté involucrada en la deshidratación y ciclación de la cadena del polí-ceto, ya formada, para generar el anillo de la isochromoquinona, estructura básica del monómero que dará lugar a la actinorhodina (fig.5, pag.12).

La presunta pertenencia de las 6 primeras actIORF's a un mismo mensajero policistrónico, el probable acoplamiento traduccional de las actIORF1/2 y actIORF3/actORF4/5 y la aparente pertenencia de las cuatro primeras al complejo sintetasa de actinorhodina nos puede llevar a pensar en este complejo enzimático como en el resultado de la interacción de los productos génicos de las actIORF1,2,3,4,5 y 6, con el que, a su vez, interaccionaría el producto génico, ya descrito, del gen actIII.

Si asumimos como posible que las repeticiones directas comentadas anteriormente marcan de alguna manera el final de la región de expresión temprana y media del "cluster" act, quedarían por identificar los mutantes de las clases actIV (asociado a una reducción) y actV_b (asociado a una oxidación), localizados previamente en esa zona (fig.7, pag.15) (Malpartida y Hopwood,1986). Así mismo, falta por asignar una posible función a las ORF's actORF 5,6,7,8 y 9 (fig.19, pag.52).

A juzgar por la probable organización transcripcional de la región, parece aceptable asociar la mutación de la clase IV con la actORF5 y/o 6 y la mutación de la clase V_b con las actORF7 y/o 8. Creemos que la actORF9 codifica un gen sin función asignada. Sin embargo, no hay que olvidar que han de existir actividades enzimáticas aún sin identificar, que probablemente intervengan en las etapas intermedias de la ruta y cuyos precursores aún no han sido caracterizados "in vivo".

La comparación de la sintetasa de actinorhodina con las sintetasas de otros poliquétidos descritos recientemente, ha revelado, como ya hemos visto, una alta homología a nivel de secuencia de DNA, de aa y de presuntas funciones (Sherman y col.,1989; Bibb y col.,1989; Malpartida, comunicación personal). Además, muestran patrones conservados en la disposición física de los genes que dan lugar a las distintas subunidades (fig.44, pag.92). Desde una perspectiva global, parece existir una cierta universalidad en la organización de las sintetasas de poliquétidos, no sabemos si apuntando hacia una posible dispersión horizontal del complejo enzimático o una evolución similar a partir de un ancestro común, quizás la sintetasa de ácidos grasos del metabolismo primario.

Tabla 7.- Naturaleza química de distintos antibióticos producidos por Streptomyces.

<u>Antibiótico</u>	<u>Org. productor</u>	<u>Naturaleza química</u>
Actinorhodina	<i>S.coelicolor</i>	2x (8 acetatos)
Dihidrogranaticina	<i>S.violaceus</i> ruber	8 acetatos
Frenolicina	<i>S.roseofulvus</i>	9 acetatos
Tetracenomicina	<i>S.glaucescens</i>	10 acetatos
Methimicina	<i>S.venezuelae</i>	1 acetato + 5 propionatos
Picromicina	<i>S.venezuelae</i>	1 acetato+ 6 propionatos
Monensina	<i>S.cinnamomensis</i>	5 acetatos + 7 propionatos + 1 butirato
Curamicina	<i>S.curacoi</i>	4 acetatos

La elevada homología que presentan enzimas equivalentes de distintas sintetasas de poliquétidos abre atractivas posibilidades de intercambio de subunidades procedentes de sistemas diferentes. La sustitución de distintas ORF's de un sistema, por sus homólogas de otros nos permitirá : (a) ver si el complejo resultante, si se forma, es funcional, (b) ver cuál es el producto inmediato de la reacción que catalice, lo que permitirá (c) identificar qué subunidades son las responsables de muchas características específicas de algunos poliquétidos, quién determina el número de subunidades a condensar, en qué momentos se realizan las distintas reducciones, deshidrataciones, etc. (d) ver si ese producto final de la catálisis de una enzima híbrida, es susceptible de ser reconocido y modificado por las enzimas posteriores de la ruta, lo que generará, entre otras cosas, (e) la posibilidad de obtener un producto final de la ruta híbrido entre los parentales.

El abanico de posibilidades que abre el investigar no sólo las sintetasas de poliquétidos, sino las rutas completas, es muy amplio. Conocer en profundidad las distintas rutas de biosíntesis de poliquétidos será uno de los primeros pasos para manipularlas. Combinar enzimas de rutas diferentes en la búsqueda dirigida de la molécula final, abriría la posibilidad de diseñar sobre el papel nuevos antibióticos.

En el camino hacia el desciframiento del papel de las ORF's sin función asignada, creemos que la localización exacta de las mutaciones de las distintas clases act nos dirá qué ORF's están implicadas en el procesamiento de los metabolitos acumulados y, consiguientemente, el tipo de proceso catalizado.

La presencia de una serie de largas repeticiones directas a continuación de la actORF9 (figs. 9,19; pags.44,52), es decir, un poco más alejadas de la zona donde se localizan físicamente las últimas mutaciones en esta región, nos induce a pensar que puedan estar relacionadas de alguna manera con uno de los límites del "cluster" act. Así mismo, la homología que estas secuencias poseen con secuencias similares implicadas en fenómenos de reorganización génica, nos hace plantearnos la posibilidad de su posible relación con la dispersión de los sistemas biosintéticos de poliquétidos. Si esto fuera así, los mecanismos utilizados podrían ser del tipo transposición (en cuyo caso podría ser interesante la búsqueda de secuencias repetidas en el otro extremo del "cluster") o quizás podrían constituir una región "caliente" para la transmisión de material genético por conjugación.

V.2.- REGION REGULADORA INTERNA AL "CLUSTER"

El análisis de la región central del "cluster", relacionada anteriormente con la regulación del sistema, ha revelado la existencia de tres presuntos genes (fig.24, pag.64). El situado a la izquierda (según fig.7, pag.15) (actIIORF2) está probablemente implicado en el mecanismo de resistencia a actinorhodina, otro central (actIIORF3) con función aún desconocida y finalmente un tercer gen (actIIORF4) que podría ser el gen regulador propiamente dicho. Las dos primeras ORF's, actIIORF2 y 3, parecen dispensables para la producción de actinorhodina.

La producción de actinorhodina en S.parvulus (especie no productora y sensible al antibiótico) cuando es transformada con el plásmido pIJ2303 sugirió, entre otras cosas, la presencia en el interior del "cluster" de la información necesaria para inducir la resistencia al antibiótico. La elevada homología de la actIIORF2 con genes de resistencia a tetraciclina parece asociar este gen con la resistencia a actinorhodina y sugerir un sistema de resistencia similar, probablemente como respuesta a un mecanismo de acción parecido. Su aparente dispensabilidad en las cepas de S.coelicolor J1501 y B385, podría sugerir la existencia de algún otro gen, funcionalmente homólogo, que supliera el defecto generado por su inactivación.

Lo que parece fuera de toda duda, es que la célula ha de ser resistente a un antibiótico cuando lo produzca, por lo que la expresión de los genes de resistencia ha de estar estrechamente relacionada con la de los genes estructurales de las rutas de biosíntesis. La riqueza de productos metabólicos que poseen los Streptomyces y la existencia de puntos oscuros sobre la producción de antibióticos, hacen posible que las cepas B385 y J1501 de S.coelicolor, pudieran producir otros poliquétidos aún sin identificar. Es más, la elevada homología a nivel de secuencia y de organización física del sistema whiE, en S.coelicolor, con los sistemas biosintéticos de los poliquétidos granaticina, tetracenomicina y actinorhodina (K.Chater, comunicación personal) (fig.44, pag.92), sugiere la probable implicación de este sistema en la producción de un nuevo poliquétido. Todo ello, unido a la alta homología existente entre los genes implicados en la biosíntesis de poliquétidos (y que podría extenderse a los mecanismos de acción de estos antibióticos y, probablemente, a los mecanismos de resistencia), puede hacer pensar que la resistencia a actinorhodina en los casos en que la actIIORF2 está inutilizada, provenga de algún sistema de resistencia a otro/s poliquétidos relacionado/s. Además, el

desconocimiento de los mecanismos de acción de los otros antibióticos descritos en las cepas S.coelicolor no nos permite, a pesar de sus diferencias a nivel molecular (fig.3, pag.9), descartar la posibilidad de mecanismos de resistencia que puedan ser utilizados con más de uno de ellos. Si eso ocurriera, el defecto del gen actIIORF2 podría ser suplido por el de otro gen de resistencia a alguno de los antibióticos no poliquétidos descritos.

Otra posibilidad que podría explicar la aparente dispensabilidad del gen actIIORF2, sería la presencia en la célula de varios genes implicados en la resistencia a actinorhodina como se ha descrito en otros sistemas. La aparición de mutaciones puntuales espontáneas supondría, si afectarían a un único gen de resistencia, la muerte celular, por lo que la disponibilidad de más de un mecanismo de resistencia sería un sistema de protección adicional (Ohnuki y col.,1985a; Tohyama y col.,1987; Birmingham y col., en prensa).

Pero, sin duda, una de las especulaciones más atractivas sobre la dispensabilidad del gen de resistencia, sería la implicación de productos de genes bifuncionales (internos o no al "cluster"). Estos genes, cuya expresión sería lógicamente anterior en el tiempo a la de los genes biosintéticos, estarían implicados en (i) proporcionar la resistencia requerida, asegurando ésta antes de que aparezcan las primeras moléculas con actividad antibiótica, y en (ii) la regulación de la expresión de uno o más "clusters" de antibióticos, con lo que la inactivación de alguno de ellos supondría bien la pérdida de producción del antibiótico si faltara una señal reguladora crucial, o bien no tendría efecto fenotípico si su función pudiera ser suplida por otro gen. En el caso concreto del herbicida Bialaphos, existen evidencias sobre la implicación del producto del gen de resistencia en la catálisis de uno de los pasos, quizás limitantes, de su ruta de biosíntesis (Murakami y col.,1986). La mutación de esta/s señal/es no supondría la muerte para la célula, sino la pérdida de producción del antibiótico.

La expresión del gen actIIORF2, presunto gen de resistencia, podría ser regulada a nivel de traducción a través de la lectura del codón TTA que parece contener. Esta posibilidad, colocaría al mecanismo de resistencia a actinorhodina bajo el control directo del gen bldA, apoyando la posible implicación del gen de resistencia en la regulación de la expresión del "cluster" como ocurre en algunos sistemas (Chater y Bruton,1985a). Del mismo modo, la utilización del codón AAT, aproximadamente 6 veces más que la media de 63 genes secuenciados (tabla 8, pag.96), podría sugerir otro cuello de botella en la lectura de este gen. De esta manera, la expresión de la resistencia a actinorhodina estaría bajo el control de señales ajenas al "cluster". El disparo de los genes estructurales de la ruta podría venir determinado por el producto del propio gen de resistencia o por la acción de genes reguladores controlados, incluso, por la misma señal que hace expresar la resistencia, generando la expresión de ambos grupos de genes simultáneamente. Dicha señal podría actuar sobre las regiones intercistrónicas del "cluster".

Tabla 8.- Comparación de los usos de codones de actIIORF2 y 63 genes de Streptomyces.*

F	TTT	-	1.4	S	TCT	-	1.6	Y	TAT	-	4.6	C	TGT	-	12.9
F	TTC	100	98.6	S	TCC	56.2	56.7	Y	TAC	100	95.4	C	TGC	100	87.1
L	TTA	1.2	0.22	S	TCA	6.2	4	*	TAA	-	3.1	*	TGA	100	81
L	TTG	1.2	2.8	S	TCG	37.5	37.7	*	TAG	-	15.9	W	TGG	100	100
L	CTT	1.2	2.4	P	CCT	-	3.2	H	CAT	-	6.4	R	CGT	6.9	6.8
L	CTC	36.1	38.6	P	CCC	50	43.1	H	CAC	100	93.6	R	CGC	44.8	49.7
L	CTA	-	0.33	P	CCA	-	1.3	Q	CAA	11.7	6.7	R	CGA	3.5	4.2
L	CTG	60.2	55.6	P	CCG	50	52.4	Q	CAG	88.3	93.3	R	CGG	44.8	39.3
I	ATT	4.3	4.3	T	ACT	-	2.1	N	AAT	25	4.2	S	AGT	16.6	9
I	ATC	95.6	92.7	T	ACC	56.2	66.2	N	AAC	75	95.8	S	AGC	83.4	91
I	ATA	-	3	T	ACA	-	2.2	K	AAA	-	4.9	R	AGA	-	18.2
M	ATG	100	100	T	ACG	43.8	29.5	K	AAG	100	95.1	R	AGG	100	81.8
V	GTT	3.5	3.4	A	GCT	-	2.9	D	GAT	-	4.2	G	GGT	5.6	8
V	GTC	52.6	55.6	A	GCC	52.9	59.4	D	GAC	100	95.8	G	GGC	60.5	64
V	GTA	-	2	A	GCA	3.5	4.1	E	GAA	31.8	18.6	G	GGA	14	9.3
V	GTG	43.8	39	A	GCG	43.5	33.6	E	GAG	68.2	81.4	G	GGG	19.7	18.7

* La primera columna se refiere al gen actIIORF2 y la segunda al total de 63 genes.

Los datos hacen referencia al porcentaje con que un aa es codificado por el codón señalado, en función de las veces que aparece ese aa. Ej : TTT (F) codifica 8 de las 568 fenilalaninas totales (tabla 3), es decir el 1.4%.

La referencia utilizada es la tabla 3 de la introducción, pag.8.

En cuanto a la posible función del gen actIIORF3, contíguo al presunto gen de resistencia, permanece aún oscura, aunque resulta interesante el probable acoplamiento traduccional entre su presunto producto génico y el del presunto gen de resistencia. Este acoplamiento traduccional no sólo es interesante por sí mismo, sino por el modo en que se realiza, TGATGA. Con esta disposición, parece como si la célula quisiera asegurarse de que la proporción (producto gen de resistencia/producto del gen actIIORF3) nunca fuera mayor que 1. La posibilidad de que el producto del gen de resistencia esté, además, involucrado en mecanismos de regulación podría permitirnos especular sobre la función del producto génico de la actIIORF3. Sin embargo, hemos de recordar que aún se mantienen sin identificar actividades enzimáticas que han de estar presentes en algún lugar del "cluster" (fig.5, pag.12). El uso de codones de este gen (tabla 9, pag.97) es comparable con el utilizado por la mayoría de los genes del género, por lo que el control de su expresión no parece realizarse a este nivel. Los datos de S1 anteriores (Malpartida, comunicación personal) parecen situar a la actIIORF3 sobre el mismo mensajero que el presunto gen de resistencia, con lo que el control de la transcripción de ambos genes sería común.

Tabla 9.- Comparación de los usos de codones de *actIIORF3* y 63 genes de *Streptomyces*. *

F	TTT	-	1.4	S	TCT	6.4	1.6	Y	TAT	22.2	4.6	C	TGT	-	12.9
F	TTC	100	98.6	S	TCC	45.2	56.7	Y	TAC	77.8	95.4	C	TGC	100	87.1
L	TTA	-	0.22	S	TCA	3.2	4	*	TAA	100	3.1	*	TGA	-	81
L	TTG	3	2.8	S	TCG	45.2	37.7	*	TAG	-	15.9	W	TGG	100	100
L	CTT	-	2.4	P	CCT	2.7	3.2	H	CAT	-	6.4	R	CGT	7.5	6.8
L	CTC	39.4	38.6	P	CCC	29.7	43.1	H	CAC	100	93.6	R	CGC	35	49.7
L	CTA	-	0.33	P	CCA	10.8	1.3	Q	CAA	-	6.7	R	CGA	5	4.2
L	CTG	57.6	55.6	P	CCG	56.7	52.4	Q	CAG	100	93.3	R	CGG	52.5	39.3
I	ATT	7.1	4.3	T	ACT	4.2	2.1	N	AAT	22.2	4.2	S	AGT	7.7	9
I	ATC	92.8	92.7	T	ACC	62.5	66.2	N	AAC	77.8	95.8	S	AGC	92.3	91
I	ATA	-	3	T	ACA	6.3	2.2	K	AAA	-	4.9	R	AGA	-	18.2
M	ATG	100	100	T	ACG	27	29.5	K	AAG	100	95.1	R	AGG	-	81.8
V	GTT	3.5	3.4	A	GCT	2	2.9	D	GAT	4.3	4.2	G	GGT	23.3	8
V	GTC	57.7	55.6	A	GCC	61.7	59.4	D	GAC	85.7	95.8	G	GGC	55	64
V	GTA	1.3	2	A	GCA	6	4.1	E	GAA	10.3	18.6	G	GGA	10	9.3
V	GTG	41	39	A	GCG	33.3	33.6	E	GAG	89.7	81.4	G	GGG	11.7	18.7

* La primera columna se refiere al gen *actIIORF3* y la segunda al total de 63 genes de *Streptomyces*.

Los datos hacen referencia al porcentaje con que un aa es codificado por el codón señalado, en función de las veces que aparece ese aa. Ej : TTT (F) codifica 8 de las 568 fenilalaninas totales (tabla 3), es decir el 1.4%.

La referencia utilizada es la tabla 3 de la introducción, pag.8.

Los experimentos de disrupción génica y de inducción de la producción de actinorhodina nos han permitido localizar el presunto gen regulador del "cluster", *actIIORF4*, confirmando su papel de activador positivo del sistema (fig. 26, pag.67).

El análisis de la secuencia del presunto gen regulador ha revelado dos estructuras del tipo "stem-loop", una a cada lado del gen. La situada en el extremo 3' del gen, descrita anteriormente (Hallam y col., 1988), actúa como un terminador de la transcripción común para el gen *actIIORF4* y para el gen *actIII*, de transcripción convergente. La otra estructura, es extraordinariamente rica en A-T, algo especialmente destacable en un microorganismo con un contenido en G-C del orden del 70%, y puede formar distintos tipos de estructura secundaria. No hemos asignado aún ninguna función biológica a esta estructura, aunque resulta sospechoso que una región tan atípica en *Streptomyces* esté situada sobre la zona promotora del gen que controla la expresión de un importante grupo de genes.

El análisis de la región promotora del gen *actIIORF4*, reveló secuencias que podrían considerarse similares a las descritas como consenso para promotores procarióticos (fig.30, pag.71). De ellas, algunas son altamente homólogas con las descritas para *E.coli* y parecen ser reconocidas por su RNA polimerasa, por lo que podrían

asociarse a aquellas secuencias promotoras de Streptomyces reconocidas por la RNA polimerasa mayoritaria σ^{35} , de mantenimiento celular (Westpheling y col., 1985). La heterogeneidad de RNA polimerasas en este género y, por tanto, de secuencias diferentes a ser reconocidas nos impiden asociar claramente, si las hubiera, secuencias de esta región con otros tipos de promotores.

En cuanto a la posible transcripción de este gen, hemos de recordar que los ensayos de S1 de alta resolución revelaron, en condiciones de máxima expresión de actinorhodina, la presencia de un solo mensajero en la zona cubierta por la sonda, por lo que asumimos la presencia de una sola actividad promotora en esas condiciones. Los experimentos de ensayo bajo diferentes condiciones de la actividad promotora en esta región, tanto en S. lividans como en S. coelicolor, parece sugerir que no existen grandes diferencias aparentes entre ambas especies en relación a la expresión de este promotor. Por su parte, los experimentos de ensayo de actividad de la región promotora del gen actIIORF4 en el plásmido pIJ4083 revelaron actividad transcripcional casi desde los primeros estadios de crecimiento, aunque este resultado ha de ser interpretado recordando que el plásmido pIJ4083 posee un alto número de copias.

A raíz de todos estos resultados (expresión en E. coli -y por tanto reconocido probablemente por la RNA polimerasa mayoritaria-, posible mensajero único, expresión relativamente temprana) y dado que la producción de actinorhodina se realiza en estadios tardíos del ciclo biológico, surge la pregunta ¿para qué transcribir este gen tempranamente?. Una de las posibles respuestas podría ser bien que realmente no se transcriba tempranamente y la actividad promotora fuera producto del efecto del alto número de copias, o bien que otra actividad promotora divergente (neutralizante), sometida a regulación específica en Streptomyces, liberara la transcripción del gen en un momento determinado. Otra hipótesis barajada para explicar el posible desfase temporal entre la transcripción del gen actIIORF4 y la producción de actinorhodina, supondría la formación de un producto génico inactivo, inmaduro, que en determinado momento sería procesado dando lugar a una molécula fisiológicamente activa que dispararía el sistema. La disponibilidad de la proteína podrá, en su momento, dar respuesta a este interrogante.

En cuanto a la traducción de este presunto gen regulador, el análisis del uso de codones (fig.24, tabla 10, pag.99) ha revelado dos regiones claramente diferenciadas, una anterior de acuerdo con los usos típicos de Streptomyces y otra posterior, bastante atípica, con una utilización de codones poco usual [TTT (30 veces más utilizado que la media), TTA (10 veces), ATA (26 veces) y GTA (11 veces)]. Una atractiva posibilidad para explicar el por qué de este uso de codones tan inusual, sería la de utilizarlo como medio de controlar la expresión del gen : una mayor o menor disponibilidad de aminoacil-t-RNA's determinaría la velocidad, incluso la imposibilidad, de su traducción. La existencia de genes que codifiquen aminoacil-t-RNA's para codones raros y su implicación en el control de la traducción de otros genes, abriría enormes posibilidades en el control de la expresión génica de un organismo, sería un sistema versátil, variado y altamente regulado al participar un gran número de productos génicos a su vez bajo control.

Tabla 10.- Comparación de los usos de codones de actIIORF4 y 63 genes de Streptomyces.*

F	TTT	33.3	1.4	S	TCT	-	1.6	Y	TAT	25	4.6	C	TGT	66.7	12.9
F	TTC	66.7	98.6	S	TCC	44.4	56.7	Y	TAC	75	95.4	C	TGC	33.3	87.1
L	TTA	2.2	0.22	S	TCA	-	4	*	TAA	-	3.1	*	TGA	-	81
L	TTG	8.8	2.8	S	TCG	45.6	37.7	*	TAG	100	5.9	W	TGG	100	100
L	CTT	4.4	2.4	P	CCT	-	3.2	H	CAT	22.2	6.4	R	CGT	18.2	6.8
L	CTC	35.6	38.6	P	CCC	16.7	43.1	H	CAC	77.8	93.6	R	CGC	18.2	49.7
L	CTA	-	0.33	P	CCA	-	1.3	Q	CAA	-	6.7	R	CGA	4.5	4.2
L	CTG	48.9	55.6	P	CCG	83.3	52.4	Q	CAG	100	93.3	R	CGG	59.1	39.3
I	ATT	30.8	4.3	T	ACT	-	2.1	N	AAT	42.9	4.2	S	AGT	-	9
I	ATC	53.8	92.7	T	ACC	58.3	66.2	N	AAC	57.1	95.8	S	AGC	100	91
I	ATA	15.4	3	T	ACA	-	2.2	K	AAA	50	4.9	R	AGA	50	18.2
M	ATG	100	100	T	ACG	41.7	29.5	K	AAG	50	95.1	R	AGG	50	81.8
V	GTT	-	3.4	A	GCT	-	2.9	D	GAT	25	4.2	G	GGT	5.6	8
V	GTC	22.2	55.6	A	GCC	35.3	59.4	D	GAC	75	95.8	G	GGC	44.4	64
V	GTA	22.2	2	A	GCA	-	4.1	E	GAA	39.1	18.6	G	GGA	27.8	9.3
V	GTG	55.6	39	A	GCG	64.7	33.6	E	GAG	60.9	81.4	G	GGG	22.2	18.7

* La primera columna se refiere al gen actIIORF4 y la segunda al total de 63 genes de Streptomyces.

Los datos hacen referencia al porcentaje con que un aa es codificado por el codón señalado, en función de las veces que aparece ese aa. Ej : TTT (F) codifica 8 de las 568 fenilalaninas totales (tabla 3), es decir el 1.4%.

La referencia utilizada es la tabla 3 de la introducción, pag.8.

La inducción de actinorhodina en la cepa J1507 (bldA) por la acción del presunto gen regulador mutagenizado (codón TTA sustituido por su homólogo TTG) demuestra, por primera vez en Streptomyces, la existencia de un posible mecanismo de regulación de la expresión génica a través de la lectura de codones raros. Esta evidencia, demuestra la implicación del producto génico del gen bldA en el control a nivel de traducción de la expresión del "cluster" act, más aún, demuestra cómo el considerado uno de los escalones superiores, quizás la encrucijada, de la cascada de señales entre el metabolismo primario y el secundario, participa directamente en el control de uno de los escalones más inferiores, lo que quitaría peso a ese papel central del gen bldA en el proceso de diferenciación bioquímica durante el ciclo biológico de Streptomyces.

La homología presentada por el producto del gen actIIORF4, presunto gen regulador, con genes implicados en el control de la expresión de otros antibióticos (dnrORE1 en el caso de daunorubicina -Hutchinson, comunicación personal- redD en el caso de prodigiosina -Narva y Feitelson, 1990- y spiromicina -Malpartida, comunicación personal-) (fig.36, pag.76), sugiere la existencia de un mecanismo similar en el control de la expresión de antibióticos desde el interior de sus

respectivos "clusters". En el caso concreto de la dnrORF1, esta posibilidad es confirmada por su capacidad de complementar la mutación de la cepa JFI (clase actII).

La presencia de un número sensiblemente mayor de codones raros en el gen actIIORF4 con respecto a redD o dnrORF1 (tabla 11) podría reflejar características específicas en el control de la expresión de estos genes, sugiriendo particularidades en puntos anteriores dentro de la presunta cascada de señales de cada una de las rutas, quizás la intervención de más genes o de sistemas de control que codifiquen t-RNA's para codones raros.

tabla 11.- Comparación del uso de los codones poco usuales que hacen los genes reguladores de poliquétidos.*

	<u>general</u> (19.460)	<u>actIIORF4</u> (255)	<u>dnrORF1</u> (273)	<u>spiraact</u> (245)	<u>redD</u> (350)
TTT	8	1	-	-	-
TTA	4	1	-	-	-
CTT	43	2	3	-	2
CTA	6	-	-	-	-
ATT	28	4	1	-	-
ATA	19	2	1	2	1
GTT	52	-	-	-	1
GTA	31	4	1	1	1
TCT	12	-	-	-	-
TCA	29	-	1	-	1
CCT	34	-	-	1	-
CCA	14	-	-	-	2
ACT	28	-	-	-	-
ACA	29	-	1	-	-
GCT	73	-	1	1	1
GCA	106	-	4	-	-
TAT	21	1	-	-	-
TAA	2	-	-	-	-
CAT	31	2	2	-	1
CAA	34	-	4	1	-
AAT	20	3	2	-	-
AAA	23	2	1	1	2
GAT	53	3	-	-	1
GAA	215	9	3	8	7
TGT	20	2	-	-	-
TGA	51	-	1	-	1
CGT	100	4	2	1	5
CGA	62	1	-	-	2
AGT	28	-	-	-	-
AGA	20	2	1	1	1
GGT	143	1	1	1	4
GGA	165	5	5	3	7

* Los datos representan el número de veces que aparece un codón determinado. Entre paréntesis aparece el número de codones del gen o, en el caso general, de los 63 genes de Streptomyces secuenciados.

El uso de codones completo de todos los genes aparece en las tablas 3, 8, 9 y 10.

Los estudios sobre la estructura primaria del producto del presunto gen regulador, actIIORF4, y las posibles estructuras secundarias que presenta, sugieren dominios de unión a DNA (figs. 34,35; pags.75,76).

Ello, nos lleva a especular sobre la posibilidad de que el control de la expresión de actinorhodina que realiza este gen, se lleve a cabo a nivel de transcripción mediante una acción directa de su producto génico sobre zonas reguladoras del interior del "cluster", probablemente sobre las regiones intercistrónicas.

La purificación del producto génico de actIIORF4 permitirá comprobar si es realmente una proteína de unión a DNA y qué regiones serían sus dianas, resolviendo muchas cuestiones sobre su mecanismo de acción.

V.3.- REGION REGULADORA DE ACCION PLEIOTROPICA.

Los datos genéticos consecuencia del estudio de la región del cromosoma de S.coelicolor denominada smas, han revelado su capacidad para inducir la producción de actinorhodina en S.lividans, lo que sugiere su implicación en el control de la producción de este antibiótico, y quizás otros metabolitos secundarios, en S.coelicolor.

Los resultados negativos de su comparación a nivel de secuencia y por Southern con otros genes reguladores descritos en Streptomyces, así como su conservación en distintas especies de este género, nos lleva a plantearnos la posibilidad de que este sistema génico constituya un nuevo escalón en la presunta cascada de señales que dan lugar a la producción de metabolitos secundarios en Streptomyces. Su situación en dicha cascada sería anterior al gen regulador interno al "cluster", y su mecanismo de acción podría estar extendido dentro del control de la expresión génica en Streptomyces.

El análisis de la secuencia de esta región, ha revelado dos ORF's que parecen estar bajo el control de un solo promotor, originando un mensajero policistrónico, lo que sugiere una relación estrecha entre ambos productos génicos a la hora de controlar los procesos en los que están implicados. El estudio de la región promotora que controla su expresión, sugiere que podría ser reconocida, al menos, por la RNA polimerasa mayoritaria en Streptomyces y que este reconocimiento podría, a su vez, estar regulado por una proteína de unión a DNA que se fijaría a un posible operador, situada sobre la presunta región -35. La presunta proteína de unión al promotor smas, podría constituir un escalón superior en la cascada de señales reguladoras comentada, hecho que parece ser apoyado por la homología de la posible secuencia anterior a la zona codificante de la smasORF1 con la zona anterior a la región codificante del gen afsB, gen con un papel asignado en dicha cascada.

En la búsqueda de una funcionalidad de las ORF's que constituyen las secuencias smas, tratamos de bloquear las distintas ORF's. Para la smasORF1 fue imposible obtener mutantes, lo que podría asociar su producto génico con una función vital para la célula (con lo que los mutantes morirían), o su implicación en la formación de esporas por lo que los lisógenos que han recombinado a través de esta ORF (teóricos mutantes) no podrían ser replicados eficientemente en el proceso de selección.

La mutagénesis de la ORF2, demostró la incapacidad de producir actinorhodina, prodigiosina y CDA en la cepa J1501 de S.coelicolor, lo que apoya la posibilidad de que este gen sea un escalón muy superior a los genes reguladores internos a cada "cluster" dentro de la presunta cascada de señales en la diferenciación bioquímica, en un punto

similar al del gen afsB. Aún no es posible concluir si el sistema smas es o no alternativo al afsB.

El uso de codones en las dos ORF's de esta región, concuerda perfectamente con el utilizado por la mayoría de los genes de Streptomyces secuenciados, sin la presencia de codones raros que pudieran sugerir una expresión regulada a nivel de traducción por el producto del gen bldA o similar.

Aunque la comparación con las bases de datos no sugirió nada relevante, la ORF1 presenta dominios homólogos a otros de proteínas de unión a DNA, dominios que en ocasiones se presentan repetidos, característico también de este tipo de proteínas. La posibilidad de un mecanismo de acción a través de una proteína de unión a DNA, aportaría nuevos datos sobre la posible semejanza entre el fragmento smas con el gen afsB, al que se le asocia con una proteína de este tipo (Horinouchi y col., 1986).

El hecho de que la mutagénesis de la smasORF3, adyacente a la región activadora, no tuviera efecto aparente que analizar, truncó una posibilidad de localizar de modo inmediato esta zona en el cromosoma de S.coelicolor.

Así, La región de 1.6 kb del cromosoma de S.coelicolor capaz de inducir la producción de actinorhodina en S.lividans podría ser un escalón nuevo en la presunta cascada de señales que conducen a la producción de metabolitos secundarios en S.coelicolor. La semejanza fenotípica del mutante smas con el gen afsB, sugiere que su situación en ella sería a un nivel similar, ver si el bloqueo del smas afecta a la expresión del afsB y viceversa podría situar de modo preciso su posición relativa en la cascada de señales, si forman parte de un circuito lineal o de circuitos paralelos estrechamente relacionados.

La expresión de los productos de los genes smasORF1 y 2, ayudará a desvelar su papel en el control de la expresión de antibióticos y su lugar en la presunta cascada de señales que da lugar a la formación de antibióticos en Streptomyces.

V.4.- VISION GENERAL.

Como hemos visto en este trabajo, el análisis de la región de expresión temprana y media del "cluster" act, ha revelado una serie importante de datos sobre la organización física y funcional de los enzimas implicados en los primeros pasos de la ruta biosintética del antibiótico poliquétido actinorhodina en S.coelicolor.

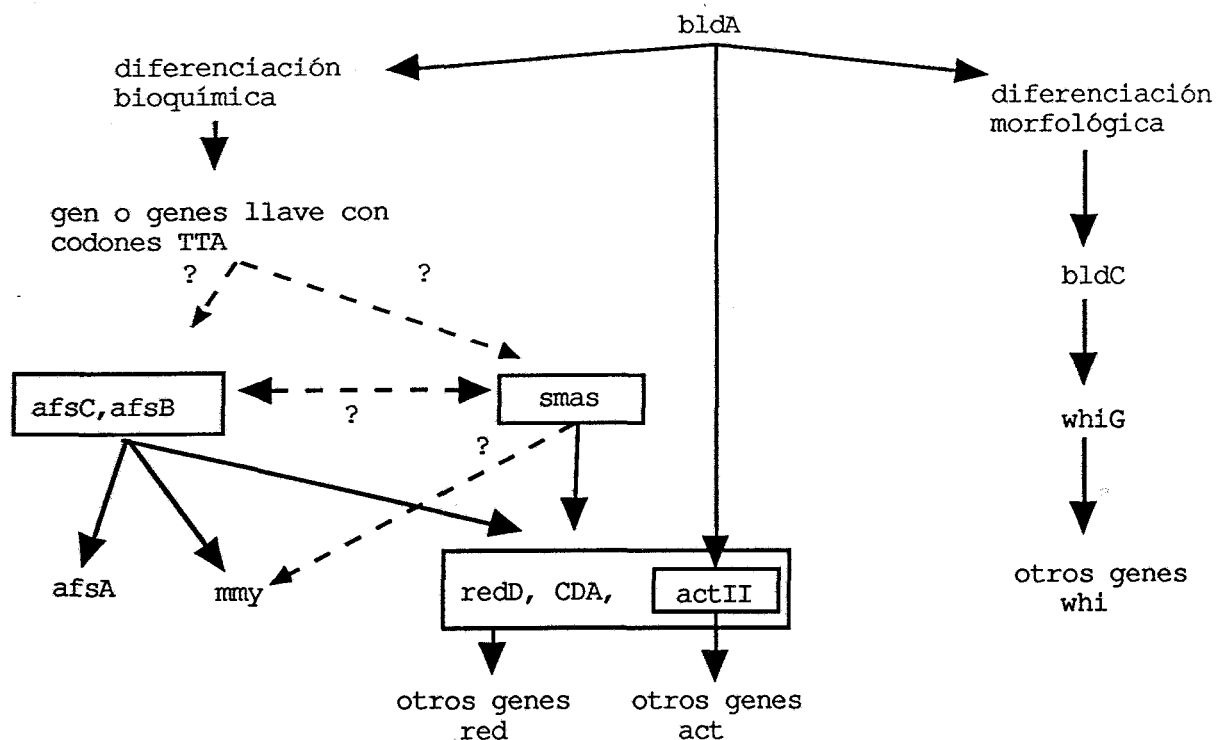
La síntesis de actinorhodina presenta gran cantidad de puntos en común con la síntesis de ácidos grasos en la formación de la molécula básica que dará lugar al antibiótico, lo que ha sido utilizado, y seguirá siéndolo, como punto de apoyo en los estudios realizados sobre el sistema. Del mismo modo, la homología que presenta con otros sistemas de biosíntesis de poliquétidos es lo suficientemente elevada como para pensar en la posibilidad de un origen común y un desarrollo más o menos divergente, lo que abre grandes posibilidades de expresión heteróloga de genes pertenecientes a rutas biosintéticas de antibióticos diferentes.

Otra de las consecuencias de lo que hemos visto hasta ahora, es la visión del control de la expresión del antibiótico actinorhodina como un fenómeno complejo en el que intervienen un elevado número de

señales de control. Hemos confirmado el control que ejerce el gen bldA sobre la expresión del "cluster" act, pero hemos comprobado que lo hace sin señales intermedias, lo que supone una variación sobre la presunta cascada de señales reguladoras postulada anteriormente (fig.4, pag.11). Este hecho, parece quitar peso al papel central que se asignaba al gen bldA en los procesos de diferenciación morfológica y bioquímica en Streptomyces. Así mismo, la presencia de un gran número de codones poco usuales en el gen regulador, actIIORF4, nos permite postular la posibilidad de un mecanismo de control de la expresión génica a través de la lectura de codones raros. Junto a ello, la existencia de nuevas secuencias implicadas en la regulación del sistema act, secuencias smas, abre nuevos interrogantes sobre los mecanismos de control de la expresión de antibióticos en Streptomyces. La situación de las secuencias smas en la presunta cascada de señales reguladoras, si la tiene, es aún incierta, aunque por los datos que poseemos podría localizarse a un nivel similar al del gen afsB (fig.45).

La regulación de la síntesis de actinorhodina se muestra como el resultado de la interacción de un conjunto de señales desde el metabolismo primario hasta la obtención de la molécula final del antibiótico. Si dichas señales constituyen un circuito lineal en el proceso, existen circuitos alternativos o es una compleja red de señales relacionadas es algo que estimulará el trabajo en el laboratorio. En cualquier caso, la manipulación de algunas de estas señales ha abierto el camino hacia la comprensión de la expresión de los antibióticos poliquétidos y el metabolismo secundario en Streptomyces.

Fig. 45.- Situación aproximada de la región smas y posible papel del gen bldA en la presunta cascada de señales reguladoras que controlan la diferenciación en Streptomyces.



En este trabajo, hemos intentado desentrañar alguno de los aspectos oscuros de la expresión del "cluster" de actinorhodina, tanto en su síntesis como en su regulación. Los esfuerzos posteriores, irán encaminados hacia el estudio de las primeras enzimas de la ruta para profundizar en el proceso de biosíntesis de antibióticos y en su manipulación en la búsqueda de nuevos fármacos. Del mismo modo, la identificación, caracterización y manipulación de nuevas señales implicadas en el control del sistema act y en su conexión con el metabolismo primario aclararán la visión global de la biosíntesis de actinorhodina en el contexto más general del metabolismo secundario y revelará aspectos interesantes del ciclo biológico de este microorganismo, permitiendo la mejor comprensión del control de la expresión génica y la posibilidad de la optimización de la producción industrial de gran número de compuestos producidos por el género Streptomyces.

VI.- CONCLUSIONES

- 1) El complejo multienzimático "poliquétido sintetasa" de actinorhodina es funcionalmente similar a las sintetasas de ácidos grasos en varios de sus dominios.
- 2) La sintetasa de actinorhodina consta, al menos, de cuatro subunidades con tres actividades, condensante de acilos, transportadora de acilos y ciclase, lo que la asemeja a una FAS de tipo II.
- 3) La "sintetasa" de actinorhodina presenta una homología muy elevada, tanto a nivel de DNA como de aa y de organización física, con las sintetasas de otros poliquétidos.
- 4) Se ha identificado y caracterizado, dentro del cluster act, el regulador positivo como una posible proteína de 28.7 kD con probable función de llave en la expresión del sistema.
- 5) El producto del gen bldA controla directamente la expresión del cluster a nivel de traducción mediada por la lectura de un codón TTA.
- 6) Se ha identificado, en colaboración con el John Innes Institute, un presunto gen de resistencia a actinorhodina en el interior del cluster act, cuya expresión podría ser dependiente del gen bldA.
- 7) Parece existir otro/s gen/es de resistencia fuera del cluster act.
- 8) Se ha identificado un nuevo complejo génico de acción pleiotrópica (smas) sobre la biosíntesis de, al menos, tres metabolitos secundarios en S.coelicolor : actinorhodina, prodigiosina y CDA.
- 9) La existencia de un nuevo complejo génico identificado (smas) sugiere para la biosíntesis de metabolitos secundarios una compleja cascada de señales que, para el cluster act, constaría de, al menos, 4 genes : bldA, afsB, smas y actIIORF4.

VII.- BIBLIOGRAFIA

Alberts,A.W. y Greenspan,M.D. En *Fatty acid metabolism and its rregulation, new comprehensive biochemistry*. Ed. Numa,S., Elsevier, Amsterdam, vol. 7, pp. 29-58. (1984).

Aguilar,A. y Hopwood,D.A. "Determination of methylenomycin A synthesis by the pSV1 plasmid from *Streptomyces violaceus-ruber* SANK 95570" *J.Gen.Microbiol.* 128 : 1893-1901. (1982).

Antonov,P.P., Ivanov,I.G., Markov,G.G. y Benigni,R. "Reassociation analysis of DNA in studying the genome size of *Streptomyces*". *Studia Biophysica*, Berlin 69 : 67-74. (1978).

Anzai, H., Murakami, T., Imai, S., Satoh, A., Nagoaka, K., Thompson, C.J. Transcriptional regulation of bialaphos biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Bacteriol.* 169 : 3482-3488. (1987).

Arraj,JA. y Marinus,M.G. "Phenotypic reversal in *dam* mutants of *Escherichia coli* K12 by a recombinant plasmid in the *dam*- gene" *J.Bacteriol.* 153 : 562-565. (1983).

Berk,A.J. y Sharp,P.A. "Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids". *Cell* 12 : 721-731. (1977).

Bibb,M.J., Ward,J.M. y Hopwood,D.A. "Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* protoplast at high frequency". *Nature* 274 : 398-400. (1978).

Bibb,M.J. y Cohen,S.N. "Gene expression in *Streptomyces* : construction and aplication of promoter-probe plasmid vectors in *Streptomyces lividans*". *Mol.Gen.Genet.* 187 : 265. (1982).

Bibb,M.J., Jansen,G.R. y Ward,J.M. "Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance (*ermE*) gene of *Streptomyces erythreus*". *Gene* 38 : 215-226. (1985).

Bibb,M.J., Biró,S., Motamedi,H., Collins,J.F. y Hutchinson,C.R. "Analysis of the nucleotide sequence of the *Streptomyces glaucescens tcml* genes provide key information about the enzmology of poliketide antibiotic biosynthesis". *THE EMBO J.* 8 : 2727-2736. (1989).

Birmingham,V. Cox,K.L. y Seno,E.T. "Tylosin resistance in a tylosin-producing strain of *Streptomyces fradie* : cloning and phenotypic analysis of trhee tylosin resistance genes" . En prensa.

Birnboim,H.C. "A rapid alkaline extraction method for tha isolation of plasmid DNA". *Methods in Enzimol.* 100 : 243-255. (1983).

Boseley,P., Moss,T., Mächler,M., Portman,R. y Birnstiel,M "Sequence orgenization of the spacer DNA in a ribosomal gene unit of *Xenopus laevis*". *Cell* 17 : 19-31. (1979).

Brown,A.G., Goodacre,J., Harbridge,J.B., Howarth,T.T.,Ponsford,R.J. y Stirling,I. "Clavulanic acid : a novel fused β -lactam isolated from *Streptomyces clavuligerus*". En *Recent advances in the chemistry of β -lactam antibiotics*. (Ed. J.Ellis.), pp. 295-298. London : Chemical Society.(1976).

- Brown, M.G.M., Weston, A., Saunders, J.R. y Humphreys, G.O. "Transformation of *E.coli* C600 by plasmid DNA at different phases of growth". FEMS Microbiol. lett. 5 : 219-222. (1979).
- Bruton, C.J. y Chater, K.F. "Nucleotide sequence of IS110, an insertion sequence of *Streptomyces coelicolor* A3(2)". Nucleic Acid Res. 15 : 7053-7065. (1987)
- Buckel, P. En informativos Boehringer Mannheim. España. Marzo. pp. 16. (1985).
- Bullock, W.O., Fernández, J.M. y Short, J.M. "XL1 blue : a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection" Biotechniques 5 : 376. (1987)
- Burns, D.M. y Beacham, I.R. "A method for the ligation of DNA following isolation from low melting temperature agarose". Anal. Biochem. 135 : 48-51. (1983).
- Buttner, M.J. y Brown, N.L. "RNA polymerase-DNA interactions in *Streptomyces* : in vitro studies of a *S.lividans* plasmid promoter with *S.coelicolor* RNA polymerase". J.Mol.Biol. 185 : 177-188. (1985).
- Buttner, M.J. y Brown, N.L. Gene 57 : 179. (1987).
- Buttner, M.J., Smith, A.M. y Bibb, M.J. "At least three different RNA polymerase holoenzymes direct transcription of the *agarase* gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor*". Cell 52 : 599-607. (1988).
- Calos, M.P. "DNA sequence for a low level promoter of the lac repressor gene and an 'up' promoter mutation" Nature, 274 : 762-765. (1978).
- Campbell, W.C., Fisher, M.H., Stapley, E.O., Albers-Schönberg, G. y Jacob, T.A. "Ivermectin: a potent new antiparasitic agent". Science Wash. 221 : 823-828. (1983).
- Chang, S.I. y Hammes, G. "Amino acid sequences of substrate-binding sites in chicken liver fatty acid synthase". Biochemistry 27 : 4753-4760. (1988).
- Chater, K.F. y Cooper, C.S. "Purified DNA-dependant RNA polymerase from *Streptomyces coelicolor* A3(2)". Annual report of the John Innes Institute 66 : 83. (1975).
- Chater, K.F., y Merrick, M.J. "*Streptomyces*". En *Developmental biology of prokaryotes*. Ed. J.H.Parish, pp. 93-114. Oxford : Blackwell. (1979).
- Chater, K.F., Hopwood, D.A., Kieser, T. y Thompson, C.J. "Gene cloning in *Streptomyces*" Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96 : 69-95. (1982)
- Chater, K.F. "Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*" En *Microbial development*, eds. Losick, R. y Shapiro, L., pp. 89-115. New York : Cold Spring Harbor Laboratory. (1984).
- Chater, K. F. y Bruton, C. J. "Resistance, regulatory and production genes for the antibiotic methylenomycin are clustered". The EMBO J. 4 : 1893-1895. (1985a).
- Chater, K.F., Bruton, C.J., Foster, S.G. y Tobeck, I. "Physical and genetic analysis of IS110, a transposable element of *Streptomyces coelicolor*. Mol. Gen. Genet. 200 : 235-239. (1985b).

Chater,K.F. y Hopwood,D.A. "Diversity of bacterial genetics". En *Genetics of bacterial diversity* (ed. D.A.Hopwood y K.F.Chater), pp 23-52. London : Academic Pres. (1988a).

Chater,K.F., Lawlor,E.J.,Méndez,C., Bruton,C.J., Davis,N.K., Plaskitt,K., Guthrie,E.P., Daly,B.L., Baylis,H.A. y Vu Trong,K. "Gene expresion during *Streptomyces* development", pp. 64-70. En *Biology of the Actinomycetes* '88. (eds. Okami,Y., Beppu,T. y Ogawara,H. Japan scientific Societies Press, Tokio). (1988b).

Chater,K.F. "Sporulation in *Streptomyces*". En *Regulation of procaryotic development*. Eds. Smith,I., Slepecky,R. y Setlow,P. American Siciety for Microbiology. (1989).

Chen,E.J. y Seeburg,P.H. "Supercoil sequencing : a fast simple method for sequencing plasmiod DNA". *DNA* 4: 165-170. (1985).

Chung,C.T. y Miller,R.H. "A rapid and convenient method for preparation and storage of competent cells". *Nucleic Acid Res.* 16 : 3580. (1988).

Covarrubias, L., Bolivar, F.: Construction and characterization of new cloning vehicles. VI. Plasmid pBR329, a new derivative of pBR328 lacking the 482-base-pair inverted duplication. *Gene* 17: 79-89. (1982).

CoatsJ.H. y Roeser,J. "Genetic recombination in *Streptomyces bikiniensis* var. *zorbonensis*". *J.Bacteriol.* 105 : 880-885. (1971).

CoatsJ.H. y Stroman,D.W."Recent studies in *Streptomyces achromogenes* subsp. *rubradiris* genetics", pp. 39-46. In E.Freerksen, I.Tarnok and J.H.Thumin (ed.), *Genetics of the actinomycetales*. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart. (1978).

Cohn,F. "Untersuchungen über Bacterien II". *Beitr. Biol. Pfl.* 1: 141-207. (1875).

Cronan,J.E., Li,W.-B., Coleman,R., Narasimhan,M. de Mendoza,D. y Schwab,J.M. "Derived amino acid sequence and identification of active site residues of *Escherchia coli* β -hydroxydecanoyl thioester dehydrase". *J.Biol.Chem.* 263 :4641-4646. (1988).

Davis,R.W. "DNA sequences of the Int-XisP_I- region of the bacteriophage λ overlapp of the Int and Xis genes" *Nucleic Acids Res.* 8 : 1765-1774. (1980)

Deveraux,J., Haeberli,P. y Smithies,O. "A comprehensive sert of sequence analysis programs for the VAX". *Nucl.Acid.Res.* 12 : 387-395.(1984).

Distler, J., Ebert, A., Mansouri, K., Pissowotzki, K., Stockmann, M., Piepersberg, W.: "Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity". *Nucleic Acids Research* 15 : 8041-8056. (1987).

Epp,J.K., Huber,M.L.B., Turner,J.R. y Schoner,B.E. "Molecular cloning and expression of carbomycin biosynthetic and resistance genes from *Streptomyces thermotolerans*". En *Biology of actinomycetes* (ed. Y.Okami, T.Beppu y H.Ogawava), pp. 82-85. Tokyo : Japa Scientific Society Press. (1988).

Feitelson,J.S.,Hopwood, D.A. "Cloning a *Streptomyces* gene for an O-methyltransferase involved in antibiotic biosynthesis". *Molecular and General Genetics* 190 : 394-398. (1983).

Feitelson, J.S., Malpartida, F., Hopwood, D.A. "Genetic and biochemical characterization of the *red* gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A(3)2". J. Gen. Microbiol. 131 : 2431-2441. (1985).

Fishman, S.E., Rosteck, P.R.J. y Hershberger, C.L. "A 2.2 kilobase repeated DNA segment is associated with DNA amplification in *Streptomyces fradie*". J. Bacteriol. 161 : 199-206. (1985).

Floss, H.G., Cole, S.P., He, X.G., Rudd, B.A.M., Duncan, J., Fujii, I., Chang, C.J., y Keller, P.J. "Regulation in secondary metabolite formation". En Kleinhauf, H., von Döhren, D., Dornauer, H., y Nasemann, G. (eds.), VCH, Weinheim, pp. 283-304. (1985).

Friend, E.J. y Hopwood, D.A. "The linkage map of *Streptomyces rimosus*". J. Gen. Microbiol. 68 : 187-197. (1971).

Gierl, A., Sshwarz-Sommer, Z. y Saedler, H. "Molecular interactions between the components of the En-I transposable element system of *Zea mays*". The EMBO J. 4 : 579-583. (1985).

Gold, L. y Stormo, G. Translation Initiation. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., y Umberger, H.E. (eds.). American Society for Microbiology, pp. 1302-1307. (1987).

Gorst-Allman, C.P., Rudd, B.A.M., Chang, C.J. y Floss, H.G. "Biosynthesis of actinorhodin. Determination of the point of dimerization". J. Org. Chem. 46 : 455-456. (1981).

Gynheung, A y Friesen, J.D. "Plasmid vehicles for direct cloning of *Escherichia coli* promoters" J. Bacteriol. 140 : 400-407. (1979).

Hale, R.S. y Leadly, P.F. Biochimie 67 : 835-839. (1985).

Hale, R.S., Jordan, K.N. y Leadly, P.F. "A small, discrete acyl carrier protein is involved in the novo fatty acid biosynthesis in *Streptomyces erithraeus*". FEBS lett 224 : 133-136. (1987).

Hallam, S.E., Malpartida, F., y Hopwood, D.A. "DNA sequence, transcription and deduced function of a gene involved in poliketide antibiotic synthesis in *Streptomyces coelicolor*". Gene 74 : 305-320. (1988).

Hardie, S.E. y McCarthy, A.D. En *Multidomain proteins-structure and evolution*. (Eds. Hardie, D.G. y Coggins, J.R.) Elsevier, Amsterdam, pp. 229-258. (1986).

Hawley, D.K. y McClure, W.R. "Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences". Nucleic Acid Res. 11 : 2237-2255. (1983).

Henderson, G., Krygsman, P., Liu, C.J., Davey, C.C. y Malek, L.T. "Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*". J. Bacteriol. 169 : 3778. (1987).

Henikoff, S. "Unidirectional digestion with ExoIII creates targeted breakpoints for DNA sequencing". Gene 28 : 351-359. (1984).

Hoess, R.H., Foeller, C., Bidwell, K y Landy, A. "Site-specific recombination functions of bacteriophage λ : DNA sequence of regulatory regions and overlapping structural genes for Int and Xis" *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77 : 2482-2486. (1980).

Hopwood, D.A. "A circular linkage map in the actinomycete *Streptomyces coelicolor*" *J.Mol.Biol.* 12 : 514-516. (1965).

Hopwood, D.A. "Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*". *Bact.Rev.* 31 : 373-403. (1967).

Hopwood, D.A., Kieser, T., Wright, H.M., Bibb, M.J. "Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66". *J. Gen. Microbiol.* 129 : 2257-2269. (1983a).

Hopwood, D.A. y Wright, H.M. "CDA is a new chromosomally-determinant antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J.Gen.Microbiol.* 129 : 3575-3579. (1983).

Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., Schrempf, H. : Genetic Manipulation of *Streptomyces* . A Laboratory Manual. Norwich, John Innes Foundation. (1985a).

Hopwood, D.A., Kieser, T., Lydiate, D.J. y Bibb, M.J. "*Streptomyces* plasmids : their biology and use as cloning vectors". In Antibiotic-producing *Streptomyces* (Ed. S.W.Queener and L.E.Day). Academic Press, New York. (1985b).

Hopwood, D.A., Malpartida, F., Kieser, H.M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujii, I., Rudd, B.A.M., Floss, H.G. y Omura, S. "Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering" *Nature* 314 : 642-644. (1985c).

Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Jansen, G.R., Malpartida, F. y Smith, C.P. "Regulation of gene expression in antibiotic-producing *Streptomyces*". En *Regulation of Gene Expression*. Booth, I. y Higgins, C. (eds.), Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge University Press. (1986a).

Hopwood, D.A., Malpartida, F. y Chater, K.F. "Gene cloning to analyse the organization and expression of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*". En *Regulation of secondary metabolite formation* (ed. H.Kleinkauf, H. von Döhren, H. Dornauer y G. Nesemann), pp. 22-33. Weinheim : VCH. (1986b).

Hopwood, D.A. : Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. The Leeuwenhock Lecture, 1987. Proceedings of the Royal Society, London B235 : 211-138. (1988a).

Hopwood, D.A. "Understanding the genetic control of antibiotic biosynthesis and sporulation in *Streptomyces*. En *Biology of actinomicetes '88*. Japan Scientific Societies Press. (1988b).

Hopwood, D.A. "Antibiotics : opportunities for genetic manipulation" *Phil.Trans.R.Soc. London* 324 : 549-562. (1989)

Horinouchi, S., Hara, O. y Beppu, T. "Cloning of a pleiotropic gene that positively control biosynthesis of A-factor, actinorhodine and prodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*". *J.Bacteriol.* 155 : 1238-1248. (1983).

Horinouchi,S.,Malpartida,F. y Hopwood, D.A."AfsB stimulates transcription of the actinorhodin biosynthetic pathway in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*".Mol.Gen.Genet. 215 : 355-357. (1988).

Huber,F.M., Pieper,R.L. y Tietz,A.J. "Dispersal of insoluble fatty acid precursors in stirred reactors as a mechanism to control antibiotic factor distribution" En *Biotechnology processes : scale-up and mixing*. (Ed. C.S.Ho y J.Y.Oldshue), pp. 249-253. New York : American Institute of Chemical Engineers. (1986).

Hutchinson,C.R., Borell,C.W., Otten,S.L., Stutzman-Engwall,K.J. y Wang,Y.G. "A perspective on drug discovery and development trough the genetic engineering of antibiotic-producing microorganisms". J.Med.Chem.. En prensa. (1990).

Hutter,R., Kieser,T., Crameri,R., y Hinterman,G."Chromosomal instability in *Streptomyces glaucescens*" Zentralbl.Bakteriol.Mikrobiol.Hyg. I Abt.Suppl. 11 : 551-559.(1981)

Ikeda,H., Kotaki,H y Omura,S. "Genetic studies of avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. J.Bacteriol. 169 : 5615-5621. (1987).

Jaurin,B. y Cohen,S.N. "*Streptomyces lividans* RNA polymerase recognise and uses *Escherichia coli* transcriptional signals" Gene 28 : 83. (1984)

Jackowski,S. y Rock,C.O. "Acetoacetyl-Acyl carrier protein siynthase, a potential regulator fatty acid biosynthesis in bacteria". J.Biol.Chem. 262 : 7927-7931. (1987).

Jansen, G.R. Bibb,M.J., Smith,C.P., Ward,J.M., Kieser,T. y Bibb,M.J. "Isolation and analysis of *Streptomyces* promoters". Microbiolgy-1985, ed. L.Lieve, pp. 392-396. Washington : American Society for Microbiolgy. (1985)

Jones,E.W. y Fink,G.F. "Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in Yeast" En J.N.Strathern, E.W.Jones y J.R.Broach.(eds.). The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. Cold Spring Harbor laboratory. N.Y. (1982).

Jones,G.H. y Hopwood,D.A. "Activation of phenoxazinone synthase expression in *Streptomyces lividans* by cloned DNA sequences from *Streptomyces antibioticus*". J.Biol. Chem. 259 : 14158-14164. (1984).

Kamimiya,S. y Weisblum,B. "Translational attenuation control of *ermSF*, an inducible resistance determinant encoding rRNA N-Methyltransferase from *Streptomyces fradie*". J.Bacteriol. 170 : 1800-1811. (1988).

Kauppinen,S. Siggaard-Anderson,M. y von Wettstein-Knowles,P. Carlsbeg Res. Commun., 53 : 357-370. (1988).

Keller,U., Krengel,U. y Haese,A. "Genetic analysis in *Sytrepotomycetes chrysomallus*"J.Gen.Microbiol." 131 : 1181-1191. (1985).

Kirby,R. y Hopwood,D.A. "Genetic determination of methylenomicin synthesis by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2)". J.Gen.Microbiol. 98 : 239-252. (1977).

Kirby,R. "Genetic mapping of *Streptomyces clavuligerus*". FEMS Microbiol.Lett. 3 : 177-180. (1978).

Klock,G., Unger,B., Gatz,C., Hillen,W., Altenbuchner,J., Schmid,K y Schmitt,R. "Heterologous repressor-operator recognition among four classes of tetracycline resistance determinants". J.Bacteriol. 161 : 326-332. (1985).

Kuo,T.M. y Ohlrogge,J.B. "The primary structure of spinach acyl carrier protein" *Archiv.Biochem. Biophys.* 224 : 290-296. (1984).

Kunze,R., y Starlinger,P. "The putative transposase of transposable element Ac from *Zea mays* L interacts with subterminal sequences of Ac". *The EMBO J.* 8 : 3177-3185. (1989).

Lakey,J.H., Lea,E.J.A., Rudd,B.A.M., Wright,H.M. y Hopwood,D.A. "A new channel-forming antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) which requires calcium for its activity". *J.Gen.Microbiol.* 129 : 3565-3573. (1983).

Lane,R., de Feyter,R., Kennedy,M., Phua,S.H. y Semon,D. "" *Nucleic Acids Res.* 14 : 9713-9728. (1986)

Lawlor,K.J., Baylis,H.A. y Chater,K.F. "Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gen encoding a t-RNA like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2)". *Genes develop.* 1 : 1305-1310.(1987).

Leong,J.M., Nunes-Duby,S.E., Oser,A.B.,Lesser,C.F., Youderian,P., Susskind,M.M. y Landy,A. "Structural and regulatory divergents among site-specific recombination genes of lambdoid phage" *J.Mol.Biol.*

Leskiw,B.K., Mevarech,M., Barritt, L.S., Jensen,S.E., Henderson,D.J., Hopwood,D.A., Bruton,C.J. y Chater,KF. "Discovery of an insertion sequence from *Streptomyces clavuligerus* and its relatedness to two transposable elements of *Streptomyces coelicolor*". *En prensa.* (1989).

Lomovskaya,N.D., Mkrtumian,N.M., Gostimskaya,N.L.y Danilenko, V.N. "Characterization of temperate actinophage C31 isolated from *Streptomyces coelicolor* A3(2)". *J.Virol.* 9 : 258-262. (1972).

Long,C.M., Virolle,M.J., Chang,S.Y., Chang,S. y Bibb,M.J. " α -amylase gene of *Streptomyces limosus* : nucleotide sequence, expresion motifs, and amino acid sequence homology to mammalian and invertebrate α -amylases". *J.Bacteriol.* 169 : 5745. (1987).

Lydiate, D.J., Malpartida, F., Hopwood, D.A. "The *Streptomyces* plasmid SCP2*: its functional analysis and development into useful cloning vectors". *Gene* 35 : 223-235.(1985).

Lynen,F. "On the structure of fatty acid synthetase of yeast" *Eur.J.Biochem.* 112 : 431-442. (1980).

Mahillon,J. y Lereclus,D. "Structural and functional analysis of *Tn4430* : identification of an integrase-like protein involved in the co-integrated-resolution process" *EMBO J.* 7 : 1515-1526. (1988).

Malpartida, F., Hopwood, D.A. "Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host". *Nature* 309 : 462-464. (1984).

Malpartida, F, Hopwood, D.A.: Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Gen. Genet.* 205 : 66-73.(1986)

Malpartida,F.,Hallam,S., Kieser,H.M., Motamedi,H., Hutchinson,C.R.,

Butler,M.J., Sugden,D.A., Warren,M., McKillop,C., Baily,C.R.,
Humphreys,G.O. y Hopwood,D.A. "Homology between *Streptomyces* genes
coding for synthesis of different poliketides used to clone antibiotic biosynthetic genes".
Nature 325: 818-821. (1987).

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. In: *Molecular Cloning A Laboratory
Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. (1982).

Marck,C. "DNA strider": a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein
sequences on the apple Macintosh family of computers" *Nucl. Acid Res.* 16: 1829-1836.
(1988).

Martín,J.F. y Demain,A.L. "Control of antibiotic biosynthesis". *Microbiol. Rev.* 44
: 230-251. (1980).

Martín,J.F. y Liras,P. "Organization and expression of genes involved in the
biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites" *Ann. Rev. Microbiol.* 43:
173-206. (1989).

Matselyukh,B.P. "Structure and function of the *Actinomyces olivaceus* genome" pp.
553-563. En K.D. MacDonald (ed.). *Second international symposium on the genetics of
industrial microorganisms.* (1976).

Maxam,A.M. y Gilbert,W. "Sequencing end-labeled DNA with base-specific
chemical cleavages". *Methods in Enzymol.* 65: 499-560. (1980).

McCarthy,A. y Hardie,G. "Fatty acid synthase - an example of protein evolution by
gene fusion" *Trends in Biochem. Sci.* 9: 60-63. (1984).

McLaughlin,J.R., Murray,C.L. y Rabinowitz,J.C. "Unique features of the
ribosome binding site sequence of the gram-positive *Staphylococcus aureus* β -lactamase
gene". *J. Biol. Chem.* 256: 11283-11291. (1981).

McMurry,L., Petrucchi,R.E. y Levy,S.B. "Active efflux of tetracycline encoded
by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*".
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3974-3977. (1980).

Méndez,C. y Chater,K.F. "Cloning of whiG, a gene critical for sporulation of
Streptomyces coelicolor A3(2)". *J. Bacteriol.* 169: 5715-5720. (1987).

Merrick,M.J. "A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of
Streptomyces coelicolor". *J. Gen. Microbiol.* 96: 299-315. (1976).

Messing,J., Crea,R. y Seeburg,P.H. "A system for shotgun DNA sequencing".
Nucleic Acid Res. 9: 309-321. (1983).

Miller,J. en "Experiments in bacterial genetics". Cold Spring Harbor Laboratory. Cold
Spring Harbor. New York. (1972).

Mohamed,A.H., Chirala,SS., Mody,N.H. Huang,W,Y y Wakil,S.J.
"Primary structure of the multifunctional α subunit protein of yeast fatty acid synthase
derived from *FAS2* gene sequence". *J. Biol. Chem.* 263: 12315-12325. (1988).

Moss,T., Boseley,P.G. y Birnstiel,M.L. "More ribosomal spacer sequences from
Xenopus laevis". *Nucl. Acid. Res.* 8: 467-516. (1980).

Motamedi, H., Hutchinson, C.R.: "Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomycin C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 4445-4449. (1987).

Murakami, T., Anzai, H., Imai, S., Satoh, A., Nagaoka, K. y Thompson, C.J. "The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus* : Molecular cloning and characterization of the gene cluster". Mol.Gen.Genet. 205 : 42. (1986).

Murphy, E., Huwyler, L. y do Carmo de Freire Bastos, M. "" EMBO J. 4 : 3357-3365. (1985)

Murray, G.M.G. "Use of Sodium Trichloroacetate and Mung Bean nuclease to increase sensitivity and precision during transcript mapping". An.Biochem. 158 : 165-170. (1986).

Narva, K., Feitelson, J.S. "Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *redD* locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2)". J. Bacteriol. 172 : 326-333. (1990).

Ohnuki, T., Katoh, T., Imanaka, T. y Aiba, S. "Molecular cloning of tetracycline resistance genes from *Streptomyces rimosus* in *Streptomyces griseus* and characterization of the cloned genes". J.Bacteriol. 161 : 1010. (1985a).

Ohnuki, T., Imanaka, T. y Aiba, S. "Self-cloning in *Streptomyces griseus* of an *str* gene cluster for the streptomycin biosynthesis and streptomycin resistance". Journal of Bacteriology 164 : 85-94. (1985b).

Okanishi, M., Suzuki, K. y Umezawa, H. "Formation and reversion of streptomycete protoplasts : cultural conditions and morphological study". J.Gen.Microbiol. 80 : 389-400. (1974).

Packer, N.M. "Biosynthesis of acetate-derived phenols (polyketides)". En The biochemistry of plants. Academic Press, Inc. vol. 4 , pp. 535-570. (1980).

Parag, Y. "Mapping and plasmid control in *Streptomyces griseus*, producer of cephamycin" pp. 258-262. In O.K.Sebek and A.I.Laskin (ed.). Genetics of industrial microorganisms. (1979).

Pigac, J. y Alacevic, M. "Mapping of oxytetracycline genes in *Streptomyces rimosus*". Periodicum Biologorum 81 : 575. (1979).

Piret, J.M. y Chater, K.F. "Phage mediated cloning of *bldA*, a region involved in *Streptomyces coelicolor* morphological development, and its analysis by genetic complementation". J.Bacteriol 169 : 3608-3616.

Pulido, D., Jiménez, A., Salas, M. y Mellado, R.P. "*Bacillus subtilis* phage ϕ 29 main promoters are efficiently recognized in vivo by the *Streptomyces lividans* RNA polymerase" Gene 49 : 377. (1987).

Rhodes, P.M., Winskill, N., Friend, E.J. y Warren, M. "Biochemical and genetic characterization of *Streptomyces rimosus* mutants impaired in oxytetracycline biosynthesis". J.Gen.Microbiol. 124 : 329. (1981).

Robinson, M., Lewis, E. y Napier, E. "Occurrence of reiterated DNA sequences in strains of *Streptomyces* produced by an interspecific protoplast fusion". Mol.Gen.Genet. 182 : 336-340. (1981).

- Rodicio, M.R. y Chater, K.F.** "Small DNA-free liposomes stimulated transfection of *Streptomyces* protoplasts". *J. Bacteriol.* 151 : 1078-1085. (1982).
- Rodicio, M.R., Bruton, C.J. y Chater, K.F.** "New derivatives of the *Streptomyces* temperate phage ϕ C31 useful for the cloning and functional analysis of *Streptomyces* DNA". *Gene* 34 : 283-292. (1985).
- Rudd, B.A.M.** "Genetics of pigmented secondary metabolites in *Streptomyces coelicolor*" PhD. Thesis, University of East Anglia, Norwich, U.K. (1978).
- Rudd, B.A.M., Hopwood, D.A.** "Genetics of actinorhodin biosynthesis by *Streptomyces coelicolor* A3(2)". *J. Gen. Microbiol.* 114 : 35-43. (1979).
- Rudd, B.A.M., Hopwood D.A.** "A pigmented mycelial antibiotic in *Streptomyces coelicolor* : control by a chromosomal gene cluster". *J. Gen. Microbiol.* 119 : 333-340. (1980).
- Sambrook, Fritsch y Maniatis.** Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press. (1989).
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R.** "DNA sequencing with chain terminating inhibitors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 5463-5467. (1977).
- Sarin, P.S.** "Molecular pharmacologic approaches to the treatment of AIDS". *A. Rev. Pharmac.* 28 : 411-428. (1988).
- Seno, E.T., Bruton, C.J. y Chater, K.F.** "The glycerol utilization operon of *Streptomyces coelicolor* : genetic mapping of *gyl* mutations and the analysis of cloned *gyl* DNA". *Mol. Gen. Genet.* 193 : 119-128. (1984).
- Seno, E.T., Baltz, R.H.** "Structural organization and regulation of antibiotic biosynthesis and resistance genes in actinomycetes". In: *Regulation of Secondary Metabolism In Actinomycetes*. (Ed. Shapiro, S.). Chemical Rubber Company, Boca Raton, Florida. pp 1-48. (1989).
- Seto, H., Sasaki, T., Imai, S., Tsuruoka, T., Ogawa, H., Satoh, A., Inouye, S., Niida, T. y Otake, N.** "Studies on the biosynthesis of bialaphos (SF-1293). 2. Isolation of the first natural products with a C-P-H bond and their involvement in the C-P-C bond formation". *J. Antibiotics.* 36 : 96. (1983).
- Schrempf, H.** "Genetic instability : amplification, deletion and rearrangement within *Streptomyces* DNA". En *Microbiology-1985*. American Society for Microbiology. (1985).
- Schüz, R. Heller, W. y Hahlbrock, K.** "Substrate specificity of chalcone synthase from *Petroselinum hortense*". *J. Biol. Chem.* 258 : 6730-6734. (1983).
- Sherman, D.H., Malpartida, F., Bibb, M., Kieser, H., Bibb, M. y Hopwood, D.A.** "Structure and deduced function of the granaticin-producing poliketide synthase gene cluster of *Streptomyces violaceus ruber* Tü22". *The EMBO J.* 8 : 2717-2725. (1989).
- Singer, M y Soll, D.** "Guidelines for DNA hybrid molecules" *Science* 181 : 1114. (1973).

Sitrin, R.D., Chang, G.W., Dingerdissen, J.J., Holl, W., Hoover, J.R.E., Valenta, J.R., Webb, L., y Snader, K.M. "Aricidins, novel glycopeptide antibiotics. II. Isolation and characterization". J. Antibiot. 38: 561-571. (1985).

Smith, H.O. y Wilcox, K.W. "A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*, I Purification and general properties". J. Mol. Biol. 51: 379-391. (1970).

Smith, C.P. "Molecular biology of the glycerol utilization operon of *Streptomyces coelicolor* A3(2)". Tesis doctoral, Universidad de East Anglia, Norwich. (1985).

Smith, C.L., Econome, J.G., Schutt, A., Klco, S. y Cantor, C.R. "A physical map of the *Escherichia coli* K12 genome". Science, wash. 236: 1448-1453. (1987).

Stanzak, R., Matsushima, P., Balz, R.H., Rao, R.N. "Cloning and expression in *Streptomyces lividans* of clustered erythromycin biosynthesis genes from *Streptomyces erythreus*". Biotechnology 4: 229-232. (1986).

Strohl, R.W., Bartel, P.L., Connors, N.C., Chun-bao Zhu, Dosch, D.C., Beale, J.M. Jr., Floss, H.G., Stutzman-Engwall, K., Otten, S.L. y Hutchinson, R.C. "Biosynthesis of natural and hybrid poliketides by anthracycline producing streptomycetes". En prensa. (1989).

Stuttard, C., Atkinson, L. y Vats, S. "Genome structure in *Streptomyces* spp. : adjacent genes on the *Streptomyces coelicolor* A3(2) linkage map have cotransducible analogs in *S. venezuelae*". J. Bacteriol. 169: 3814-3816. (1987).

Stutzman-Engwall, K.J., Hutchinson, C.R. "Multigene families for anthracycline antibiotic production in *Streptomyces peucetius*". Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 3135-3139. (1989).

Summerton, J., Atkins, T. y Bestwick, R. "A rapid method for preparation of bacterial plasmids". An. Biochem. 133: 79-94. (1983).

Thompson, C.J., Ward, J.M. y Hopwood, D.A. "DNA cloning in *Streptomyces* : resistance genes from antibiotic-producing species". Nature 286: 525-527. (1980).

Thompson, C.J., Ward, J.M. y Hopwood, D.A. "Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in streptomycetes". J. Bacteriol. 151: 668-677. (1982).

Tohyama, H., Okami, Y. y Umezawa, H. "Nucleotide sequence of the streptomycin phosphotransferase and amidinotransferase genes from *Streptomyces griseus*". Nucl. Acid. Res. 15: 1819. (1987).

Tomick, P.K. "*Streptomyces* cloning : useful recombinant DNA systems and a summation of cloned genes". Antimicrob. Agents Chemother. 32: 1465-1471. (1988).

Uchiyama, H. y Weisblum, B. En *Microbiology 1985*. Ed. Leive, L. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 375-378. (1985).

Vara, J.A., Pulido, D., Lacalle, R.A. y Jiménez, A. "Two genes in *Streptomyces alboniger* puromycin biosynthesis pathway are closely linked". Gene 69: 135-140. (1988).

Vats, S. Stuttard, C. y Vining, L.C. "Transductional analysis of chloramphenicol biosynthesis genes in *Streptomyces venezuelae*". J. Bacteriol. 169: 3809-3813. (1987).

Wakil, S.J. Ann. Ny Acad. Sci. 478: 203-219. (1986).

Ward, J.M., Janssen, G.R., Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Bibb, M.J. "Construction and characterisation of a series of multi-copy promoter-probe vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator". *Mol. Gen. Genet.* 203 : 468-478. (1986).

Watson, J.D. y Crick, F.H.C. "Molecular structure of nucleic acids : a structure for deoxyribose nucleic acid". *Nature* : 171 : 737-738. (1953).

Westpheling, J., Raney, M. y Losick, R. "RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor*". *Nature* 313 : 22-27. (1985).

Woese, C.R. "Bacterial evolution". *Micobiol. Rev.* 51 : 221-271. (1987).

Wright, L.F. y Hopwood, D.A. "Actinorhodin is a chromosomally determined antibiotic in *Streptomyces coelicolor* A3(2)". *J. Gen. Microbiol.* 96 : 289-297. (1976).

Yanisch-Perron, C., Viera, J., Messing, J. "Improved M13 cloning vector and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors". *Gene* 33 (1985) 103-119.

Young, F.E. y Wilson, G.A. "*Bacillus subtilis*". En *Handbook of genetics*, vol. 1, ed. R.C. King, pp 69-114. New York : Plenum Press. (1974).

Zalkin, H. y Ebbole, D.J. "Organization and regulation of genes encoding biosynthetic enzymes in *Bacillus subtilis*". *J. Biol. Chem.* 263 : 1595-1598. (1988).